

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE PARASPEZIFISCHE
STIMULIERUNG DES IMMUNSYSTEMS
(PARAMUNISIERUNG) MIT EINFACH-
ODER KOMBINATIONSPRÄPARATEN
AUS BAKTERIELLEN LYSATEN
UND PARAPOXVIREN

Christine Borneff

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0075

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität
München
Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c.mult.A.Mayr

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PARASPEZIFISCHE
STIMULIERUNG DES IMMUNSYSTEMS (PARAMUNISIERUNG)
MIT EINFACH- ODER KOMBINATIONSPRÄPARATEN AUS
BAKTERIELLEN LYSATEN UND PARAPOXVIREN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig- Maximilians- Universität
München

von
Christine Borneff
aus
Erlangen
München 1986

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München**

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Koreferent: Prof. Dr. Dr.habil. W. Ahne

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

A. EINLEITUNG	1
B. THEORETISCHER TEIL	2
1. ALLGEMEINE EINLEITUNG	3
1.1. Zielsetzung und Aufgabenstellung	3
1.2. Bedeutung der Untersuchung	4
1.3. Aufbau und Gliederung der Arbeit	5
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	6
2.1. Grundlagen der Psychologie	6
2.2. Grundlagen der Pädagogik	7
2.3. Grundlagen der Erziehungswissenschaften	8
2.4. Grundlagen der Sozialwissenschaften	9
2.5. Grundlagen der Naturwissenschaften	10
2.6. Grundlagen der Geisteswissenschaften	11
2.7. Grundlagen der Medizin	12
2.8. Grundlagen der Kunst	13
2.9. Grundlagen der Religion	14
2.10. Grundlagen der Philosophie	15
2.11. Grundlagen der Ethik	16
2.12. Grundlagen der Logik	17
2.13. Grundlagen der Mathematik	18
2.14. Grundlagen der Physik	19
2.15. Grundlagen der Chemie	20
2.16. Grundlagen der Biologie	21
2.17. Grundlagen der Geologie	22
2.18. Grundlagen der Astronomie	23
2.19. Grundlagen der Meteorologie	24
2.20. Grundlagen der Klimatologie	25
2.21. Grundlagen der Umweltwissenschaften	26
2.22. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	27
2.23. Grundlagen der Sportwissenschaften	28
2.24. Grundlagen der Musikwissenschaften	29
2.25. Grundlagen der Bildwissenschaften	30
2.26. Grundlagen der Filmwissenschaften	31
2.27. Grundlagen der Medienwissenschaften	32
2.28. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	33
2.29. Grundlagen der Informationswissenschaften	34
2.30. Grundlagen der Rechtswissenschaften	35
2.31. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	36
2.32. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	37
2.33. Grundlagen der Technikwissenschaften	38
2.34. Grundlagen der Bauwissenschaften	39
2.35. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	40
2.36. Grundlagen der Forstwissenschaften	41
2.37. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	42
2.38. Grundlagen der Jägerwissenschaften	43
2.39. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	44
2.40. Grundlagen der Tierwissenschaften	45
2.41. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	46
2.42. Grundlagen der Tierwissenschaften	47
2.43. Grundlagen der Umweltwissenschaften	48
2.44. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	49
2.45. Grundlagen der Sportwissenschaften	50
2.46. Grundlagen der Musikwissenschaften	51
2.47. Grundlagen der Bildwissenschaften	52
2.48. Grundlagen der Filmwissenschaften	53
2.49. Grundlagen der Medienwissenschaften	54
2.50. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	55
2.51. Grundlagen der Informationswissenschaften	56
2.52. Grundlagen der Rechtswissenschaften	57
2.53. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	58
2.54. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	59
2.55. Grundlagen der Technikwissenschaften	60
2.56. Grundlagen der Bauwissenschaften	61
2.57. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	62
2.58. Grundlagen der Forstwissenschaften	63
2.59. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	64
2.60. Grundlagen der Jägerwissenschaften	65
2.61. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	66
2.62. Grundlagen der Tierwissenschaften	67
2.63. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	68
2.64. Grundlagen der Tierwissenschaften	69
2.65. Grundlagen der Umweltwissenschaften	70
2.66. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	71
2.67. Grundlagen der Sportwissenschaften	72
2.68. Grundlagen der Musikwissenschaften	73
2.69. Grundlagen der Bildwissenschaften	74
2.70. Grundlagen der Filmwissenschaften	75
2.71. Grundlagen der Medienwissenschaften	76
2.72. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	77
2.73. Grundlagen der Informationswissenschaften	78
2.74. Grundlagen der Rechtswissenschaften	79
2.75. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	80
2.76. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	81
2.77. Grundlagen der Technikwissenschaften	82
2.78. Grundlagen der Bauwissenschaften	83
2.79. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	84
2.80. Grundlagen der Forstwissenschaften	85
2.81. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	86
2.82. Grundlagen der Jägerwissenschaften	87
2.83. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	88
2.84. Grundlagen der Tierwissenschaften	89
2.85. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	90
2.86. Grundlagen der Tierwissenschaften	91
2.87. Grundlagen der Umweltwissenschaften	92
2.88. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	93
2.89. Grundlagen der Sportwissenschaften	94
2.90. Grundlagen der Musikwissenschaften	95
2.91. Grundlagen der Bildwissenschaften	96
2.92. Grundlagen der Filmwissenschaften	97
2.93. Grundlagen der Medienwissenschaften	98
2.94. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	99
2.95. Grundlagen der Informationswissenschaften	100
2.96. Grundlagen der Rechtswissenschaften	101
2.97. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	102
2.98. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	103
2.99. Grundlagen der Technikwissenschaften	104
2.100. Grundlagen der Bauwissenschaften	105
2.101. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	106
2.102. Grundlagen der Forstwissenschaften	107
2.103. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	108
2.104. Grundlagen der Jägerwissenschaften	109
2.105. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	110
2.106. Grundlagen der Tierwissenschaften	111
2.107. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	112
2.108. Grundlagen der Tierwissenschaften	113
2.109. Grundlagen der Umweltwissenschaften	114
2.110. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	115
2.111. Grundlagen der Sportwissenschaften	116
2.112. Grundlagen der Musikwissenschaften	117
2.113. Grundlagen der Bildwissenschaften	118
2.114. Grundlagen der Filmwissenschaften	119
2.115. Grundlagen der Medienwissenschaften	120
2.116. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	121
2.117. Grundlagen der Informationswissenschaften	122
2.118. Grundlagen der Rechtswissenschaften	123
2.119. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	124
2.120. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	125
2.121. Grundlagen der Technikwissenschaften	126
2.122. Grundlagen der Bauwissenschaften	127
2.123. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	128
2.124. Grundlagen der Forstwissenschaften	129
2.125. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	130
2.126. Grundlagen der Jägerwissenschaften	131
2.127. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	132
2.128. Grundlagen der Tierwissenschaften	133
2.129. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	134
2.130. Grundlagen der Tierwissenschaften	135
2.131. Grundlagen der Umweltwissenschaften	136
2.132. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	137
2.133. Grundlagen der Sportwissenschaften	138
2.134. Grundlagen der Musikwissenschaften	139
2.135. Grundlagen der Bildwissenschaften	140
2.136. Grundlagen der Filmwissenschaften	141
2.137. Grundlagen der Medienwissenschaften	142
2.138. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	143
2.139. Grundlagen der Informationswissenschaften	144
2.140. Grundlagen der Rechtswissenschaften	145
2.141. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	146
2.142. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	147
2.143. Grundlagen der Technikwissenschaften	148
2.144. Grundlagen der Bauwissenschaften	149
2.145. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	150
2.146. Grundlagen der Forstwissenschaften	151
2.147. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	152
2.148. Grundlagen der Jägerwissenschaften	153
2.149. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	154
2.150. Grundlagen der Tierwissenschaften	155
2.151. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	156
2.152. Grundlagen der Tierwissenschaften	157
2.153. Grundlagen der Umweltwissenschaften	158
2.154. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	159
2.155. Grundlagen der Sportwissenschaften	160
2.156. Grundlagen der Musikwissenschaften	161
2.157. Grundlagen der Bildwissenschaften	162
2.158. Grundlagen der Filmwissenschaften	163
2.159. Grundlagen der Medienwissenschaften	164
2.160. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	165
2.161. Grundlagen der Informationswissenschaften	166
2.162. Grundlagen der Rechtswissenschaften	167
2.163. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	168
2.164. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	169
2.165. Grundlagen der Technikwissenschaften	170
2.166. Grundlagen der Bauwissenschaften	171
2.167. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	172
2.168. Grundlagen der Forstwissenschaften	173
2.169. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	174
2.170. Grundlagen der Jägerwissenschaften	175
2.171. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	176
2.172. Grundlagen der Tierwissenschaften	177
2.173. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	178
2.174. Grundlagen der Tierwissenschaften	179
2.175. Grundlagen der Umweltwissenschaften	180
2.176. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	181
2.177. Grundlagen der Sportwissenschaften	182
2.178. Grundlagen der Musikwissenschaften	183
2.179. Grundlagen der Bildwissenschaften	184
2.180. Grundlagen der Filmwissenschaften	185
2.181. Grundlagen der Medienwissenschaften	186
2.182. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	187
2.183. Grundlagen der Informationswissenschaften	188
2.184. Grundlagen der Rechtswissenschaften	189
2.185. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	190
2.186. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	191
2.187. Grundlagen der Technikwissenschaften	192
2.188. Grundlagen der Bauwissenschaften	193
2.189. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	194
2.190. Grundlagen der Forstwissenschaften	195
2.191. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	196
2.192. Grundlagen der Jägerwissenschaften	197
2.193. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	198
2.194. Grundlagen der Tierwissenschaften	199
2.195. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	200
2.196. Grundlagen der Tierwissenschaften	201
2.197. Grundlagen der Umweltwissenschaften	202
2.198. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	203
2.199. Grundlagen der Sportwissenschaften	204
2.200. Grundlagen der Musikwissenschaften	205
2.201. Grundlagen der Bildwissenschaften	206
2.202. Grundlagen der Filmwissenschaften	207
2.203. Grundlagen der Medienwissenschaften	208
2.204. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	209
2.205. Grundlagen der Informationswissenschaften	210
2.206. Grundlagen der Rechtswissenschaften	211
2.207. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	212
2.208. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	213
2.209. Grundlagen der Technikwissenschaften	214
2.210. Grundlagen der Bauwissenschaften	215
2.211. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	216
2.212. Grundlagen der Forstwissenschaften	217
2.213. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	218
2.214. Grundlagen der Jägerwissenschaften	219
2.215. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	220
2.216. Grundlagen der Tierwissenschaften	221
2.217. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	222
2.218. Grundlagen der Tierwissenschaften	223
2.219. Grundlagen der Umweltwissenschaften	224
2.220. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	225
2.221. Grundlagen der Sportwissenschaften	226
2.222. Grundlagen der Musikwissenschaften	227
2.223. Grundlagen der Bildwissenschaften	228
2.224. Grundlagen der Filmwissenschaften	229
2.225. Grundlagen der Medienwissenschaften	230
2.226. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	231
2.227. Grundlagen der Informationswissenschaften	232
2.228. Grundlagen der Rechtswissenschaften	233
2.229. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	234
2.230. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	235
2.231. Grundlagen der Technikwissenschaften	236
2.232. Grundlagen der Bauwissenschaften	237
2.233. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	238
2.234. Grundlagen der Forstwissenschaften	239
2.235. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	240
2.236. Grundlagen der Jägerwissenschaften	241
2.237. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	242
2.238. Grundlagen der Tierwissenschaften	243
2.239. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	244
2.240. Grundlagen der Tierwissenschaften	245
2.241. Grundlagen der Umweltwissenschaften	246
2.242. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	247
2.243. Grundlagen der Sportwissenschaften	248
2.244. Grundlagen der Musikwissenschaften	249
2.245. Grundlagen der Bildwissenschaften	250
2.246. Grundlagen der Filmwissenschaften	251
2.247. Grundlagen der Medienwissenschaften	252
2.248. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	253
2.249. Grundlagen der Informationswissenschaften	254
2.250. Grundlagen der Rechtswissenschaften	255
2.251. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	256
2.252. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	257
2.253. Grundlagen der Technikwissenschaften	258
2.254. Grundlagen der Bauwissenschaften	259
2.255. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	260
2.256. Grundlagen der Forstwissenschaften	261
2.257. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	262
2.258. Grundlagen der Jägerwissenschaften	263
2.259. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	264
2.260. Grundlagen der Tierwissenschaften	265
2.261. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	266
2.262. Grundlagen der Tierwissenschaften	267
2.263. Grundlagen der Umweltwissenschaften	268
2.264. Grundlagen der Gesundheitswissenschaften	269
2.265. Grundlagen der Sportwissenschaften	270
2.266. Grundlagen der Musikwissenschaften	271
2.267. Grundlagen der Bildwissenschaften	272
2.268. Grundlagen der Filmwissenschaften	273
2.269. Grundlagen der Medienwissenschaften	274
2.270. Grundlagen der Kommunikationswissenschaften	275
2.271. Grundlagen der Informationswissenschaften	276
2.272. Grundlagen der Rechtswissenschaften	277
2.273. Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften	278
2.274. Grundlagen der Ingenieurwissenschaften	279
2.275. Grundlagen der Technikwissenschaften	280
2.276. Grundlagen der Bauwissenschaften	281
2.277. Grundlagen der Landwirtschaftswissenschaften	282
2.278. Grundlagen der Forstwissenschaften	283
2.279. Grundlagen der Fischereiwissenschaften	284
2.280. Grundlagen der Jägerwissenschaften	285
2.281. Grundlagen der Veterinärwissenschaften	286
2.282. Grundlagen der Tierwissenschaften	287
2.283. Grundlagen der Pflanzenwissenschaften	288
2.284. Grundlagen der Tierwissenschaften	289
2.285. Grundlagen der Umweltwissenschaften	290
2	

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINLEITUNG	1
B SCHRIFTTUM	3
1. Lokale Wirkung von paraspezifischen Immunstimulantien bei intraperitonealer Applikation	3
1.1. Infektionsschutz	3
1.2. Hemmung des Tumorwachstums	6
1.3. Stimulierung der Makrophagen, NK-Zellen und Interferonbildung	7
2. Lokale Wirkung von paraspezifischen Immunstimulantien bei oraler Applikation	11
2.1. Infektionsschutz	11
2.2. Stimulierung der Makrophagen, NK-Zellen und Interferonbildung	12
3. Lokale Wirkung von paraspezifischen Immunstimulantien bei nasaler Applikation	15
C EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
1. Material und Methoden	19
1.1. Versuchstiere	19
1.2. Herstellung bakterieller Lysate	19
1.2.1. Bakterienstämme	19
1.2.2. Keimvermehrung	19
1.2.3. Hydrolyse	20

	Seite
1.3. Herstellung viraler Paramunitätsinducer	21
1.4. Herstellung der Kombinationsinducer	21
1.5. Infektionsbelastungsversuche	22
1.5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Modell	22
1.5.2. Aujeszky-Virus - Modell	23
1.5.3. <i>Listeria monocytogenes</i> - Modell	23
1.5.4. <i>Salmonella typhimurium</i> - Modell	24
1.5.5. Auswertung	24
1.6. Nachweis der spontanen zellvermittelten Cytotoxizität	25
1.7. Nachweis der Phagozytose im Chemilumines- zenztest	26
1.7.1. Präparation und Vorbehandlung der Makrophagen	26
1.7.2. Präparation der opsonisierten Partikel	27
1.7.3. Durchführung der Messungen	28
1.8. Nachweis der Interferon-Induktion im in- direkten Plaque-Reduktionstest	29
1.9. Nachweis der CSA (colony stimulating activity)	29
2. Ergebnisse	31
2.1. Infektionsbelastungsversuche	31
2.2. Cytotoxizitätstest	43
2.3. Chemilumineszenztest	46

	Seite
2.4. Indirekter Plaque-Reduktionstest	50
2.5. Colony stimulating - Test	51
D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	53
E ZUSAMMENFASSUNG	60
SUMMARY	62
F LITERATURVERZEICHNIS	64

A EINLEITUNG

Die prophylaktische und therapeutische Verwendung von Paramunitätsinducern zur Stimulierung der körpereigenen Abwehr gewinnt immer mehr Eingang in die tierärztliche Praxis. Die derzeit in der Human- und Tiermedizin verwendeten Inducer sind Bioprodukte aus bestimmten Viren oder aus Bakterienlysaten bzw. bakteriellen Spaltprodukten. In der Tiermedizin finden bisher nur Einfachinducer Verwendung, während es in der Humanmedizin seit kurzem auch Kombinationsinducer zur oralen Anwendung gibt. Kombinationspräparate zur Stimulierung der körpereigenen Abwehr sind sicher auch für die Tiermedizin interessant, da man sich durchaus vorstellen kann, daß sie umfassender stimulieren als Einfachpräparate.

Die bekannten Kombinationsinducer aus der Humanmedizin enthalten nur inaktivierte Bakterien bzw. bakterielle Spaltprodukte. Über die paramunisierende Wirkung von Kombinationsinducern aus bakteriellen und viralen Komponenten liegen dagegen bisher keine Erfahrungen vor. Gerade diese Kombinationen wären aber interessant, da virale oder bakterielle Substanzen die verschiedenen Mechanismen der körpereigenen Ab-



wehr unterschiedlich stark stimulieren. Von einem Kombinationsinducer aus viralen und bakteriellen Komponenten kann man deshalb gegen die sehr häufigen Mischinfektionen in der Nutz- und Heimtierhaltung eine bessere Wirkung erwarten als von einem Einfachpräparat aus einer der beiden Komponenten.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde bei der Maus die Wirksamkeit von Einfachinducern aus bakteriellen Lysaten oder dem Parapoxvirus ovis (PIND-ORF) mit Kombinationsinducern aus zwei oder drei der Einfachinducer verglichen. Das Ziel dieser Arbeit war nicht die Entwicklung optimal wirksamer Einfachinducer, sondern die Untersuchung auf synergistische oder antagonistische Wirkungen einzelner Inducer bei der Verwendung in einem Kombinationspräparat. Die Wirksamkeitsbestimmung erfolgte a) in Infektionsmodellen und b) über den Nachweis stimulierter NK (Natural Killer)-Zellen und Phagozyten sowie der Interferonbildung und des CSA (colony stimulating activity)-Mediators im Serum.

B SCHRIFTTUM

1. Lokale Wirkung von paraspezifischen Immunstimulantien bei intraperitonealer Applikation

1.1. Infektionsschutz

Die lokale Wirkung von Immunstimulantien wurde sehr häufig in Infektionsmodellen gemessen, bei denen die Inducer und die Testkeime intraperitoneal appliziert wurden. Sehr viele Autoren bewerteten das "Peritoneal-Modell" als geeignet für die Bestimmung der lokalen Wirkung von Immunstimulantien. Zur Testinfektion eigneten sich sowohl Bakterien als auch Viren, wobei in der Regel Viren bevorzugt wurden.

Mit dem Inducer "Bru-Pel", einem Wasser-Äther-Extrakt aus *Brucella abortus* (YOUNGNER et al., 1974) wurden Versuchsmäuse (KERN et al., 1976) intraperitoneal behandelt und mit Encephalomyocarditis-Virus (EMC) bzw. Herpesvirus hominis Typ 2 (HVH-2) belastet. Bei einer Mortalität der Kontrolltiere von 100% konnte im EMC-Virus-Modell durch Anwendung von Bru-Pel 6 Stunden vor der Infektion die Überlebensrate auf 60%, bei gleichzeitiger Anwendung auf 67% gesteigert werden. Im Challengemodell mit HVH-2-Virus blieb Bru-Pel dagegen ohne signifikante Wirkung.

Einen signifikanten Schutz erzielten auch KIRCHNER et al. (1977) durch die Impfung von Mäusen mit *Corynebakterium*

parvum 7 Tage vor der Belastung mit Herpes-simplex-Virus (HSV). C.parvum war jedoch nur bei prophylaktischer Anwendung wirksam. Nach intraperitonealer Gabe zur gleichen Zeit mit der HSV-Virus-Infektion oder nach der Infektion konnte keine Wirkung festgestellt werden. GLASGOW et al. (1977) impften Versuchstiere mit C.acnes, C.parvum bzw. BCG (Bacillus Calmette Guerin) 2 Wochen vor einer Belastung mit HSV-2 und erzielten eine Senkung der Mortalitätsrate von 87% bei den Kontrolltieren auf 10%, 20% bzw. 47%. C.parvum schützte bei gleichzeitiger Anwendung auch gegen das Mäusehepatitis-Virus Typ 3 (SCHINDLER et al., 1981). Bei Anwendung der Corynebakterien 3 Tage vor der Belastung konnte allerdings keine Schutzwirkung beobachtet werden.

Der Interferon-Inducer Phagen-ds-RNA wurde im EMC-Virus-Modell intraperitoneal getestet (NOSIK et al., 1984). Bei Anwendung 24 Stunden vor der Belastung überlebten 67% der Mäuse, bei Anwendung 4 Stunden vorher erhöhte sich die Überlebensrate auf 70% im Vergleich zu 22,5% bei der Kontrollgruppe. Die therapeutische Applikation 4 Stunden oder 4 und 24 Stunden nach dem Challenge steigerte die Überlebensrate nur auf 47,5% bzw. 40%.

TAKAHASHI et al. (1984) untersuchten die Abhängigkeit der Wirkung von der Dosierung mit einem aus Pityrospo-

rum-Keimen hergestellten Inducer im *Salmonella-typhimurium*-Infektionsmodell. Mit einer Dosis von 50mg erhielten sie eine Überlebensrate von 70%; bei 10mg bzw. 5mg dagegen nur eine Überlebensrate von 50%. 5% betrug die Überlebensrate bei den mit 1mg oder mit Placebo vorbehandelten Tieren. Die Substanzen wurden dabei immer 4 Tage vor der Testinfektion verabreicht. Um auch den Einfluß des Applikationszeitpunktes zu bestimmen, wurde *P.ovale* bei einer Dosis von 5mg 14, 10, 7, 4 bzw. 1 Tag vor dem Challenge injiziert. Die höchste Schutzrate wurde bei der Applikation 4 Tage vor dem Challenge erreicht (35%); auch die Anwendung am Tag vor der Belastung erzielte eine Schutzwirkung (25%). Dagegen wiesen die 14, 10 und 7 Tage vor der Infektion behandelten Tiere keinen Schutz auf. Wirksamkeitsunterschiede wurden zwischen den Arten *P.orbicularis* und *P.ovale* nicht festgestellt. Die Art *P.pachydermatis* erzielte nur eine sehr geringe immunstimulierende Wirkung.

In einem Infektionsmodell mit *Klebsiella pneumoniae* wurde die unspezifische Abwehr durch intraperitoneale Injektion von MDP (Muramyl-Dipeptid), einer immunologisch aktiven Untereinheit der mycobakteriellen Zellwand, die auch synthetisch herzustellen ist, erhöht (GALELLI et al., 1984).

1.2. Hemmung des Tumorwachstums

In verschiedenen Versuchen wurde die lokale Wirkung von Immunstimulantien auf das Tumorwachstum untersucht. Eine Hemmung des Tumorwachstums konnte auf diese Weise für Inducer, die auf der Basis von Corynebakterium parvum-Keimen, Lactobazillen und Brucellen hergestellt wurden, nachgewiesen werden (SPREAFICO, 1985). Corynebakterien erzielten im Tierexperiment auch eine anti-tumorale Wirkung bei Mammakarzinomen, Osteosarkomen und einer Reihe weiterer Neoplasien (GATENBY und BASTEN, 1980; BARTLETT et al., 1980; MATHEWS, 1981). ROSKOWSKI et al. (1980) erzielten bei intraperitonealer Verabreichung von Corynebakterium acnes ein verzögertes Wachstum bzw. eine Rückbildung bei subcutan applizierten Sarkom-180-Zellen. Die intratumorale Injektion des Inducers hatte jedoch eine noch bessere Wirkung. OETTGEN et al. (1976) erreichten ebenfalls bei Applikation der Corynebakterien "so nahe wie möglich" am Tumor das beste Ergebnis.

Die Wirkung von Lactobazillen gegen Sarkom-180-Zellen bzw. Leukämie-Zellen wurden von KATO et al. (1981, 1983) untersucht. Die intraperitoneale Behandlung mit Lactobazillen erhöhte signifikant die Aktivität der Peritonealmakrophagen sowie deren cytostatische Funktion gegenüber den Tumorzellen. Auch der aus Brucellen

hergestellte Inducer "Bru-Pel" konnte bei intraperitonealer Anwendung vor bzw. nach dem Challenge das Wachstum von Sarkom-180-Zellen hemmen und die Todesrate der Mäuse senken.

Die beste Wirkung auf Tumoren hatte das Immunstimulans OK 432, das aus einem schwach virulenten Streptococcus pyogenes-Stamm hergestellt wird (KAI et al., 1979; KONDO et al., 1982). ISHII et al. (1976) wiesen nach Behandlung mit OK 432 bei tumorinfizierten Mäusen eine Hemmung des Tumorstwachstums durch aktivierte Peritonealmakrophagen nach. Auch bei diesem Inducer war die intratumorale Applikation therapeutisch am wirkungsvollsten (MORIYASU et al., 1982; KONDO et al., 1982).

1.3. Stimulierung der Makrophagen, NK-Zellen und Interferonbildung

Neben der Bestimmung der Überlebensrate in Infektionsmodellen wurden sehr oft nach intraperitonealer Applikation von Immunstimulantien auch die Zellveränderungen bzw. die Zellaktivitäten im Peritonealexsudat untersucht. Am häufigsten konnte eine Aktivierung der Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden. Als Immunstimulantien eigneten sich hierfür BCG (TRACEY

et al., 1977; GERMAIN et al., 1975; HIBBS, 1975; HEISE und WEISER, 1969; FREEDMAN et al., 1980; YARKONI et al. 1977), Bestatin^R (DICKNEITE et al., 1984), MDP (CHEDID 1983), *Yersinia enterocolica*- und *Bordetella pertussis*-Präparate (RUIZ-BRAVO et al., 1985; FISHEL et al., 1976), *Corynebakterium parvum* (ROSKOWSKI et al., 1980), *Brucella abortus* (SCHULTZ et al., 1978) und *Lactobacillus plantarum* (BLOKSMA, 1981). Außer den biologischen Immunstimulantien ließen sich auch mit synthetischen Präparaten wie Pyran Copolymer, Polyanionen und Inosiplex^R (Methisoprinol) die Peritonealmakrophagen aktivieren (SCHULTZ et al., 1977; IDRIS, 1980). Die aktivierten Phagozyten setzten Mediatoren frei und hatten eine gesteigerte Tendenz zur Ausbreitung und Migration, was eine erhöhte Cytotoxizität dieser Zellen gegen Tumorzellen zur Folge hatte.

Bei den Untersuchungen von TRACEY mit BCG wurde den stimulierten Zellen des Peritonealexsudates als Zielzellen Aszites-Tumorzellen angeboten. Die cytolytische Aktivität war schon nach Stunden nachweisbar und erreichte 4 Tage post applicationem den Höchstwert. Lebende BCG-Keime stimulierten eine höhere Aktivität als durch Hitze inaktivierte Keime. Der jeweils verwendete Mäusestamm hatte ebenfalls einen Einfluß auf die stimulierende Wirkung von BCG.

PUCETTI verglich nach Behandlung mit BCG, C.parvum und Pyran Copolymer die Funktion der Peritonealmakrophagen. Dazu wurden die Versuchstiere 7 Tage bzw. 10 Tage (BCG) vor der Gewinnung des Peritonealexsudates mit den Inducern vorbehandelt. Alle drei Substanzen stimulierten im Vergleich zu den Kontrolltieren die Makrophagen gleich gut. Die Peritonealmakrophagen waren zu 80% aktiv und wiesen eine dreifach erhöhte Tendenz zur Ausbreitung und Adhäsion an Glas und Plastik auf. FREEDMAN erzielte dasselbe Ergebnis 4 Tage nach Behandlung der Mäuse mit BCG.

Peritonealmakrophagen von Mäusen, die 5mg/Kg Bestatin^R alle 2 Tage verabreicht bekamen, wiesen 5 bzw. 13 Tage nach der ersten Applikation eine deutlich erhöhte Phagozytoserate gegenüber *Listeria monocytogenes*-Keimen auf. Die Phagozytoserate erreichte nach 4 Stunden den Höchstwert (DICKNEITE, 1984). Durch lebende bzw. inaktivierte BCG-Keime erzielte auch YARKONI im *Listeria monocytogenes*-Modell eine Stimulierung der Peritonealmakrophagen.

Die Makrophagen-aktivierende Wirkung des *Brucella abortus*-Präparates "Bru-Pel" ist von SCHULTZ nachgewiesen worden. Er untersuchte auch Polyanionen und Pyran Copolymer und konnte eine dosisabhängige, hohe

Cytotoxizität gegen Leukämie-Zellen feststellen. Bei diesem Abwehrvorgang fand nachweislich eine Adhäsion der Tumorzellen an die Makrophagen statt.

Nach intraperitonealer Stimulierung von Mäusen mit BCG, *C.parvum*, OK 432 und *Lactobazillus plantarum* konnte im Peritonealexsudat auch eine Erhöhung der Natural-Killer-Zellaktivität nachgewiesen werden (WOLFE et al., 1976, 1977; KOBAYASHI et al., 1980). Der Gipfel der lytischen Aktivität der NK-Zellen im Chromfreisetzungstest war nach Applikation von BCG (TRACEY, 1977) 4-8 Stunden und nach Applikation von *Lactobazillen* 4 Tage nach der Stimulierung erreicht (BLOKSMA, 1981).

In einer vergleichenden Untersuchung aktivierte OK 432 mehr NK-Zellen im peritonealen Bereich als zum Beispiel MDP oder BCG (SAKITA et al., 1985). OK 432 steigerte nicht nur bei der Maus, sondern auch beim Menschen die Zahl der nachweisbaren NK-Zellen (OSHIMI et al., 1979, 1980; USHIDA und MIKSHE, 1983; WAKASUGI, 1982).

Nach intraperitonealer Applikation von *E.coli*-Endotoxin und OK 432 an Mäuse konnte im Peritonealexsudat auch Interferon nachgewiesen werden (MATSUBARA et al.,

1979). Viele Autoren nehmen an, daß das Interferon vor allem für die Aktivierung der Makrophagen und NK-Zellen eine wichtige Rolle spielt und damit letztlich für die Stärke der Cytotoxizität dieser Zellen gegenüber Tumorzellen verantwortlich ist (DOMKE und KIRCHNER, 1985; MATSUBARA et al., 1979). Andererseits liegen auch Untersuchungen vor, die eine Interferon-unabhängige Cytotoxizität nachweisen. MATSUBARA injizierte Mäusen OK 432 intraperitoneal und erzielte eine Makrophagen- und T-Zell- unabhängige Interferon-Induktion, die 24 Stunden nach der Behandlung ihr Maximum erreichte. MANDEVILLE et al. (1982) vermuten unterschiedliche genetische Regulationsmechanismen für die Interferon-Induktion bzw. NK-Zell-Aktivität.

2. Lokale Wirkung von paraspezifischen Immunstimulanzien bei oraler Applikation

2.1. Infektionsschutz

Durch orale Applikation von Dodekoral^R, einem aus 12 Hitzeinaktivierten Enterobakterien bestehendem Inducer, an Mäuse erzielte RAETTIG (1982) 9 Tage post applicationem einen Schutz gegen eine orale Infektion mit Columbia-SK-Virus. Die Überlebensrate der

behandelten Tiere war signifikant höher als die der Kontrolltiere. Der gleiche Autor konnte durch orale Anwendung eines Präparates aus E.coli-Bakterien Mäuse gegen eine Infektion mit einem Sarkomvirus schützen. RUDENT et al. (1984) verabreichten den Versuchstieren oral einen Glykoproteinextrakt aus *Klebsiella pneumoniae* O₁K₁ ("Biostim") und erzielten damit einen Schutz gegen Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae*. Ein neuer Paramunitätsinducer ist das Broncho-Vaxom^R, das aus lyophilisierten Lysaten der 5 bei Atemwegsinfektionen am häufigsten vorkommenden Keimarten besteht. Nach oraler Verabreichung an Kinder, die an rezidivierenden Infektionen der oberen Atemwege litten, kam es zu einer Abnahme der Infekte (LOSA und MAESTRONI, 1984; AHRENS, 1984; KELLER, 1984; GIRARD und FLEURY, 1979). SPREAFICO (1980) konnte dagegen bei oraler Anwendung eines *Corynebakterium parvum*-Inducers keine positive Wirkung nachweisen.

2.2. Stimulierung der Makrophagen, NK-Zellen und Interferonbildung

Nach 10-tägiger oraler Verabreichung von Hitzeinaktivierten *Salmonella typhimurium*-Keimen war bei Mäusen

die Aktivität der Peritonealmakrophagen gegenüber Streptococcen um das 2,5-fache erhöht (RAETTIG 1982a, 1982b; SCHULZE et al., 1973; SCHLEWINSKI et al., 1971). Bestatin^R, ein Inducer aus chemisch aufgeschlossenen Streptomyces olivoreticuli-Keimen, steigerte nach oraler Anwendung bei Tumorpatienten die NK-Aktivität im peripheren Blut (BLOMGREN, 1979, 1980) und die Phagozytoserate der Granulozyten (JARSTRAND und BLOMGREN, 1982). Oral mit Broncho-Vaxom vorbehandelte Kinder wiesen eine Zunahme der allogenen "mixed-lymphocyte"-Reaktion auf (LOSA und MAESTRONI, 1984; AHRENS, 1984; KELLER, 1984; GIRARD und FLEURY, 1979).

Außer diesen wenigen Ergebnissen aus oralen Stimulierungsversuchen sind vor allem Untersuchungen über das Vorkommen und die Lokalisation von Immunzellen in der Darmschleimhaut durchgeführt worden.

GOLDER und DOE (1983) entwickelten eine Methode zur Isolierung von Intestinal-Makrophagen. Damit konnten sie nachweisen, daß von den mononucleären Zellen aus der Mucosa 30% zur Phagozytose fähig sind. Nach Adhäsion der Makrophagen an die Oberfläche von Plastik war die Ausbeute an Zellen/g Mucosa etwas niedriger, dafür waren von diesen mononucleären Zellen jedoch 90% zur Phagozytose fähig; 55% hatten Fc-Rezeptoren

für IgG und 94% ein Ia-ähnliches Antigen auf der Membran.

GIBSON et al. (1984) wies die Cytotoxizität von mononucleären Zellen aus menschlicher Darmschleimhaut gegen K-562-Zellen im Chromfreisetzungstest nach. TAGLIA-BUE (1981, 1982) konnte bei den granulierten Lymphozyten in der Mäusemucosa eine spontane cytolytische Aktivität gegen Tumorzellen feststellen und vermutet, daß die cytotoxischen NK-Zellen im Dünndarm der Maus zur Zellpopulation der granulierten Lymphozyten gehören. GIBSON und JEWELL (1985) verglichen die Form und Funktion der NK-Zellen im Darmepithel des Menschen mit den NK-Zellen im Blut und stellten fest, daß das Oberflächenantigen bei beiden Ähnlichkeit aufweist; außerdem wurden beide NK-Zellen in gleichem Maße von Interferon bzw. Interleukin 2 stimuliert. KLEIN et al. (1984) konnten mit dem Chromfreisetzungstest das simultane Auftreten von drei Effektorpopulationen bei den intraepithelialen Lymphozyten nachweisen: spezifische, cytotoxische T-Lymphozyten, unspezifische NK-Zellen und spontan cytotoxische Zellen. Die unspezifische Aktivierung von cytotoxischen Effektorpopulationen spielt eine wichtige Rolle bei der lokalen Infektabwehr des Darmes.

Die Lymphozyten der Lamina propria wurden von HOGAN et al. (1985) untersucht; er konnte eine weitere, unspezifisch cytotoxisch wirkende Effektorzelle nachweisen. Diese sog. LAK-Zelle (Lymphokine-activated killer cell) wird in Gegenwart von Interleukin 2 aktiviert und ist in der Lage, NK-resistente Tumorzelllinien zu lysieren.

3. Lokale Wirkung von paraspezifischen Immunstimulationen bei nasaler Applikation

Die ersten Ergebnisse über die unspezifischen Abwehrmechanismen der Schleimhäute der Atemwege stammen aus Untersuchungen bei infizierten Mäusen. Der Nachweis der Interferonbildung bei viralen Atemwegserkrankungen wurde von GARDNER et al. (1970), HILL et al. (1969) und MOEHRING und FORSYTHE (1971) erbracht. JOHNSON et al. (1975) stimulierten durch Anwendung von einem *Listeria monocytogenes*-Aerosol eine erhöhte Aktivität der Makrophagen im Serum gegen *Listerien* und *Streptococcus pneumoniae*. Die aktivierten Makrophagen stammten aber nicht aus dem peripheren Blut, sondern aus dem Respirationstrakt.

NK-Zellen in der Lunge wies erstmalig PUCETTI (1980) bei der Maus nach. FARRELL et al. (1985) vermuteten, daß die Bildung der NK-Zellen in der Lunge auf das von aktivierten Makrophagen im interstitiellen Gewebe gebildete Interferon zurückgeht.

Die unspezifischen Abwehrmechanismen des Respirationstraktes können durch eine nasale Applikation von Immunstimulantien via Aerosol bei Versuchstieren gesteigert werden. Nach Applikation eines kombinierten Inducers (IRS 19^R), der aus den Lysaten von 19 Bakterien besteht, die hauptsächlich bei humanen Infektionen der Atemwege vorkommen, wurde eine signifikante, dosisabhängige Steigerung der Phagozytoseaktivität bei Alveolarmakrophagen gegenüber Streptococcen erzielt (RAET-TIG, 1976). Nach intranasaler Stimulierung mit BCG erhöhte sich bei Mäusen nach einer Infektion mit einem Influenzavirus (Stamm A|PR8) die Überlebensrate auf 67% im Vergleich zu 21% bei den nicht behandelten Kontrolltieren (SPENCER et al., 1977). MAYR et al. (1979a, 1979b) testeten die Wirksamkeit des Inducers PIND-AVI bei intranasaler Applikation in einem Pseudomonas-Modell. Nach einmaliger, prophylaktischer Anwendung senkte sich die Mortalitätsrate post infectionem von 80% (Kontrolltiere) auf 53%.

In der Praxis erzielten RÖDDER et al. (1979) bei Rindern einen guten Erfolg mit der intranasalen Applikation eines Inducers auf der Basis eines attenuierten IBR | IPV-Virus (Bayferon^R). Durch einmalige, intranasale Anwendung des Präparates wurde der Heilungsprozeß bei an Rinderrippe erkrankten Tieren in seinem Ablauf signifikant verkürzt.

BUUS und GRÜNDER (1986) behandelten 109 Rinder intranasal (lokal) mit Bayferon^R oder zweimal intramuskulär (parenteral) mit Duphamun^R, einem aus inaktivierten Hühnerpockenvirus hergestelltem Paramunitätsinducer. Bei den mit Bayferon^R geimpften Tieren erkrankten 4% in der ersten Woche post applicationem, während in der mit Duphamun^R behandelten Gruppe 15% und in der Kontrollgruppe 14% Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung zeigten. Der Krankheitsverlauf war bei beiden Präparaten milder als bei den unbehandelten Kontrolltieren. Auch bei therapeutischer Anwendung war Bayferon^R dem Vergleichspräparat Duphamun^R überlegen. Den ebenfalls intranasal anzuwendenden Inducer Imuresp^R, eine Mutante eines Parainfluenza-3-Virus, testete MÜLLER (1982) bei 2242 Kälbern, die auf Kälbermärkten verkauft wurden. Die Ergebnisse beinhalteten eine relativ hohe Zahl an Erkrankungen (insgesamt

ca. 10%) auch bei den behandelten Tieren, die in diesem Fall jedoch auch auf die zahlreichen anderen exogenen Faktoren zurückzuführen sein können.

Die Präparate Bayferon^R, Imuresp^R und B.S.K.^R (Filtrat von *Bacillus subtilis*-Kulturen) sind in einem Feldversuch in Rinderbeständen von KÜHNEL und GRÜNDER (1985) verglichen worden. Bayferon^R und Imuresp^R wurden dabei lokal (intranasal) angewendet, während B.S.K.^R parenteral appliziert wurde. Bei prophylaktischer Anwendung der Inducer ist eine signifikante Senkung der respiratorischen Erkrankungen (enzoot. Bronchopneumonie) erzielt worden. Eine geringere Ausbildung der Krankheitssymptome gegenüber der Kontrollgruppe wurde auch bei den therapeutisch behandelten Tieren festgestellt. Zwischen den drei geprüften Präparaten sind lediglich geringe Wirkungsunterschiede festgestellt worden, wobei das Wirkungsoptimum bei den therapeutisch geimpften Rindern jeweils am dritten Tag erreicht worden ist.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche NMRI-Mäuse verwendet. Das durchschnittliche Gewicht bei Versuchsbeginn schwankte je nach Test zwischen 25 - 40 Gramm. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten und ad libitum mit Pellets (Sniff) und Leitungswasser versorgt.

1.2. Herstellung bakterieller Lysate

1.2.1. Bakterienstämme

Zur Herstellung der bakteriellen Lysate als Paramunitätsinducer fanden Bakterienstämme aus der instituts-eigenen Stammsammlung Verwendung. Dabei handelte es sich um einen

Bordetella (B.) *bronchiseptica* - Stamm (Nr.2) und einen *Escherichia* (E.) *coli* 0101 : K99 - Stamm.

Die lyophilisierten Bakterienstämme wurden bei 4°C in Ampullen aufbewahrt.

1.2.2. Keimvermehrung

Zur Anzüchtung wurde das Lyophilisat in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und auf Blutagarplat-

ten verimpft. Anschließend wurden die Keime in einem Fermenter (New Brunswick) mit einem 25l-Tank in Standard-I-Medium (Merck) vermehrt. Während der Bebrütungszeit von 16 - 18 Stunden bei 37°C ist das Medium ständig gerührt und mit steriler Luft begast worden. Die Fermenterkultur wurde durch Zentrifugation (3000 UpM, 30 min) 1:20 eingeeengt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

1.2.3. Hydrolyse

Das *B.bronchiseptica*- und *E.coli*- Keimkonzentrat wurde zur alkalischen Hydrolyse mit 1n NaOH auf pH 12,0 eingestellt. Die Zugabe der Lauge erfolgte tropfenweise, während das Keimkonzentrat gleichmäßig gerührt wurde. Zur Kontrolle des pH-Wertes dienten Spezialindikator-Stäbchen (Merck). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C auf einem Mikroschaker wurde das Keimkonzentrat mit 1n HCl auf den pH-Wert 7,2 eingestellt und weitere 48 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zugabe der Salzsäure erfolgte wieder tropfenweise unter ständigem Rühren der Suspension. Das hydrolysierte Keimkonzentrat wurde mit physiologischer NaCl auf eine optische Dichte (Multiscan Photometer, Flow) von 1100 (Extinktionswert bei 405 nm) eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Hydrolysate bei 4°C gelagert.

1.3. Herstellung viraler Paramunitätsinducer

Der Paramunitätsinducer PIND-ORF wurde aus dem attenuierten Parapoxvirus ovis (ORF), Stamm D 1701, in Zellkulturen hergestellt und enthält pro ml mindestens $10^{7,5}$ KID₅₀. Die Inaktivierung erfolgte durch Gammabestrahlung (Strahlenquelle: Gammacel 220, Atomic Energy of Canada, LTD) mit 1400 krad. Nach Zugabe von 2,5% succinylierter Gelatine (Gelofusine, Laboratories Hausmann Inc., St. Gallen, Schweiz) und der Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 bis 7,4 wurde das Präparat in 2ml-Portionen lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei -20°C gelagert.

1.4. Herstellung der Kombinationsinducer

Die Kombinationspräparate enthielten zu gleichen Teilen E.coli- und B.bronchiseptica- Lysate und PIND-ORF. Um eine gleichwertige Konzentration der Wirkstoffe bei den Einfach- und den Kombinationsinducern zu gewährleisten, wurden die Einfachinducer vor der Anwendung im Verhältnis 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

1.5. Infektionsbelastungsversuche

1.5.1. *Pseudomonas aeruginosa* - Modell

Die Mäuse wurden mit dem zu prüfenden Inducer (0,2 ml) ein- oder zweimal intraperitoneal vorbehandelt und 24 Stunden später mit einem *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm aus der institutseigenen Stammsammlung infiziert. Die Keime wurden auf einer Normalagarplatte angezüchtet und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde der Keimrasen mit 3 ml Kochsalzlösung abgeschwemmt.

Die Belastung erfolgte intraperitoneal mit 0,1 ml der 1:20 verdünnten Keimsuspension. Die Challengedosis war so eingestellt, daß bei den Kontrolltieren, die mit physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt wurden, 80-100% starben. Die LD₅₀ des *Pseudomonas*-Stammes für Mäuse lag bei 3×10^8 Keimen/ml. Als Grundlage der Berechnung der LD₅₀ diente die Absterberate von Kontrolltieren, die mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Bakteriensuspension belastet wurden (SPEARMAN-KÄRBER, aus CAVALLI-STORZA, 1969). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich auf 4 Tage post infectionem.

1.5.2. Aujeszky-Virus - Modell

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit dem Inducer (0,2 ml i.p.) erfolgte 24 Stunden vor der Infektionsbelastung mit Aujeszky-Virus. Als Challenge-Virus wurde der institutseigene Aujeszky-Virus-Stamm "H2-HP" in der 23. Kulturpassage in fetalen Rinderlungenzellen verwendet. Die Infektionsdosis betrug pro Tier 10-50 LD₅₀. Sie wurde in 0,2 ml intraperitoneal appliziert und war so eingestellt, daß die Mortalität der Kontrollgruppe bei 100% lag. Die Beobachtungszeit betrug 14 Tage.

1.5.3. *Listeria monocytogenes* - Modell

In den beiden Versuchsreihen wurde den Mäusen 24 Stunden vor bzw. 24 Stunden vor und nach dem Challenge 0,2 ml des jeweiligen Inducers appliziert. Der *Listeria*-Stamm war aus der institutseigenen Stammsammlung. Zur Herstellung der Challengesuspension wurden die Listerien auf Blutagarplatte angezüchtet und nach 18 Stunden mit 3 ml NaCl abgeschwemmt. Der Challenge erfolgte intraperitoneal mit 0,1 ml der 1:20 verdünnten Bakteriensuspension (ca. 1×10^6 Keime). Die Absterberate bei den Kontrolltieren betrug 90-95%. Die infizierten Tiere wurden für 8 Tage beobachtet.

1.5.4. *Salmonella typhimurium* - Modell

In diesem Versuchsmodell wurden den Mäusen die Inducer oral mit der Sonde (0,2 ml, 2x an 2 aufeinanderfolgenden Tagen) oder über das Trinkwasser (Verdünnung 1:20, 1:200 für 2 Wochen täglich) verabreicht. Zur Herstellung der Challengesuspension wurde ein *Salmonella typhimurium* (L₁)-Stamm aus der institutseigenen Stammsammlung verwendet. Die Salmonellen sind für 24 Stunden bei 37°C auf Normalagar vermehrt und anschließend mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt worden. Die Infektion erfolgte oral mit der Sonde und zwar mit 0,2 ml der unverdünnten Abschwemmung (Keimzahl ca. 5×10^9 Keime). Die Absterberate der Kontrollgruppe lag bei 60%. Die Beobachtung der Versuchstiere erstreckte sich über 14 Tage.

1.5.5. Auswertung

Zur Ermittlung der dosisabhängigen Wirksamkeit bzw. Infektionshemmung wurde die Reduktion der Todesrate in Prozent nach der Vorbehandlung mit dem Paramunitätsinducer und seiner entsprechenden Verdünnungsstufen ermittelt. Als Maß für die Infektionshemmung galt der Wirkungsindex (WI), der sich nach folgender Formel berechnet:

$$WI = \frac{b - a}{b} \times 100$$

a = Mortalität der Versuchsgruppe in %

b = Mortalität der Kontrollgruppe in %

Die geforderte Mindestwirksamkeit erreichte ein Inducer im Infektionsmodell bei einem Wirkungsindex von 20.

Um einen Wirkungsvergleich unter den verschiedenen Inducern durchführen zu können, wurden für die einzelnen Komponenten die Wirkungseinheiten (WE) pro ml berechnet. Anhand der Wirkungsindices bei verschiedenen Verdünnungen der Inducer ließen sich die Wirkungseinheiten pro applizierter Dosismenge errechnen; und zwar war eine WE / applizierter Dosismenge bei der Verdünnungsstufe erreicht, bei der noch ein Wirkungsindex von 20 erzielt wurde.

1.6. Nachweis der spontanen zellvermittelten Cytotoxizität

Für den Cytotoxizitätstest wurden 16-18g schwere NMRI-Mäuse 24 Stunden vor dem Test mit 0,2 ml (i.p.) des jeweils zu prüfenden Paramunitätsinducers vorbehandelt. Die Cytotoxizität in der Milzzellpopulation die-

ser Mäuse wurde mit einem Cr^{51} (Amersham-Buchler)-Freisetzungstest untersucht. Die Arbeitsmethode ist von MAYR et al. (1986) beschrieben worden. Bei jedem Test diente die Aktivität unbehandelter oder Placebo-behandelter NMRI-Mäuse als Parameter für die Beurteilung der spezifischen Cytotoxizität der Milz-Effektorzellen inducerbehandelter Mäuse, ebenso wie als positive Kontrolle die Cytotoxizität NDV-Virusbehandelter NMRI-Mäuse mitbeurteilt wurde (HEBERMAN, 1982; BÜTTNER, 1984).

1.7. Nachweis der Phagozytose im Chemilumineszenztest

1.7.1. Präparation und Vorbehandlung der Makrophagen

Die Phagozytoserate wurde bei aktivierten Peritonealmakrophagen gemessen. Die Vorbehandlung der NMRI-Mäuse (ca. 40g) erfolgte 24 Stunden vor dem Test mit den verschiedenen Inducern (0,2 ml i.p.). Vor der Gewinnung der Peritonealmakrophagen wurde den mit Äther eingeschläfertten Mäusen 5 ml MEM (Eagles minimal essential medium) in die Bauchhöhle injiziert und anschließend das Peritoneum vorsichtig massiert. Nach ca. 7 Minuten wurde die Flüssigkeit mit einer Pasteur-Pipette wieder aufgezogen. Der Peritonealinhalt von jeweils 10 Tieren bildete ein Pool.

Die Peritonealflüssigkeit wurde bei 1000 UpM für 10 min zentrifugiert und der Bodensatz in 3 ml Säurepuffer (RPMI 1640, ohne Phenolrot, Seromed Nr F 1275) resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde der Bodensatz in 3 ml Lysisreagenz gelöst, für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert und nochmals zentrifugiert (1000 UpM, 10 min). Der erythrozytenfreie Bodensatz wurde dann in 3 ml RPMI aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der dabei gewonnene Bodensatz in 2 ml RPMI resuspendiert, mit Trypanblau gefärbt und die darin enthaltenen Makrophagen gezählt. Die Makrophagenlösung wurde für den Test auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

1.7.2. Präparation der opsonisierten Partikel

200 mg Zymosan wurde mit PBS (Phosphat buffered saline) einmal gewaschen. Anschließend wurde das Zymosan in 10 ml Humanserum, das einem Pool von 60 Spendern entstammte, aufgenommen. Die Lösung wurde im Wasserbad bei 37°C für 60 min erhitzt, anschließend zentrifugiert (1000 UpM, 5 min) und der Bodensatz in 10 ml PBS aufgelöst. Das opsonisierte Zymosan wurde in 1 ml-Portionen eingefroren und bei -70°C vorrätig gehalten. (ALLEN und LOOSE, 1976).

1.7.3. Durchführung der Messungen

Die 6 Kanäle des Chemilumineszenzgerätes (Berthold Biolumat LB 9505) wurden jeweils mit 0.25 ml der Makrophagenlösung, 1,4 ml RPMI und 0,1 ml Luminol gefüllt. Durch das Luminol werden die durch den bei der Phagozytose freiwerdenden Sauerstoff verursachten Lichtimpulse verstärkt. Luminol wurde in einer Verdünnung von 1:50 der Stammlösung (Aldrich-Chemie) zugegeben. Makrophagen unbehandelter Tiere wurden zur Kontrolle unter den gleichen Bedingungen getestet. Alle Röhrchen wurden vor der Eingabe in das Gerät gut gemischt und geschüttelt. Im Anschluß an die Basis-messung nach 10 Minuten wurde zu jeder Probe 0,1 ml opsonisiertes Zymosan zugegeben und nochmals geschüttelt. Anschließend wurden die bei der Phagozytose auftretenden Lichtimpulse (CpM= Counts per Minute) gemessen. Der an das Chemilumineszenzgerät angeschlossene Computer zeichnete die Kurven der in der Zeiteinheit gezählten Lichtimpulse auf und errechnete die dazugehörigen Integralwerte. Die Hauptmessung dauerte 60 Minuten.

(Methode nach SCHLEUPNER und GLASGOW, 1978).

1.8. Nachweis der Interferon-Induktion im indirekten Plaque-Reduktionstest

Im indirekten Plaque-Reduktionstest wurden Serum-Interferon-negative Mäuse mit den Paramunitätsinducern zweimal im Abstand von 24 Stunden behandelt (0,5 ml i.p.), um dann im Serum zu bestimmten Zeiten nach der Behandlung in einem in-vitro-Zellsystem in vivo gebildetes Interferon nachzuweisen. Der Test wurde nach der von MAYR et al. (1986) beschriebenen Methode durchgeführt.

1.9. Nachweis der CSA (colony stimulating activity)

Die Bestimmung der Serum-CSA von NMRI-Mäusen erfolgte mit Knochenmarkszellkulturen nach der modifizierten Methode von BRADLEY und METCALF (1966), die auch von WOLF (1986) verwendet wurde.

Vor der Serumgewinnung wurden die Versuchstiere mit den 1:10 verdünnten Paramunitätsinducern vorbehandelt (0,2 ml i.p.). Die Seren von 3 Mäusen wurden gepoolt. Zu jeweils 33 µl Serum wurden 1×10^4 kernhaltige Knochenmarkszellen/ml semisolidem Agar-Medium-Gemisch zugegeben. Die Knochenmarkszellen wurden nach der von METCALF beschriebenen "crush"-Methode aus den Femora von zwei unvorbehandelten NMRI-Mäusen gewonnen.

Nach 7-tägiger Inkubation bei 37°C in einem CO₂-Brut-schrank (7,5% CO₂) wurde die Zahl der Zellaggregate mit mehr als 50 Zellen bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf einen Laborstandard (Milzzellen-konditioniertes Medium) bezogen.

2. Ergebnisse

2.1. Infektionsbelastungsversuche

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die paramunisierende Wirkung von Kombinationsinducern mit der der jeweiligen Einfachinducer verglichen. Bei den Präparaten handelte es sich um Lysate aus *E.coli*- und *B. bronchiseptica*- Keimen und um PIND-ORF. Die Wirksamkeit wurde zunächst im "Pseudomonas-Modell" einzeln oder in den Kombinationen *B.bronchiseptica*- und *E.coli*- Lysat bzw. *B.bronchiseptica*-, *E.coli*- Lysat und PIND-ORF untersucht. Zur Wirksamkeitsbestimmung kamen die Inducer unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10 bis 1:1000 zur Anwendung. Die Applikation erfolgte intraperitoneal (0,2 ml) oder subcutan (0,2 ml) 24 Stunden vor der Testinfektion. In Abbildung 1 (i.p.-Applikation) und 2 (s.c.-Applikation) sind die Dosis-Wirkungskurven für die verschiedenen Präparate im "Pseudomonas-Modell" dargestellt.

Die Kurvenverläufe der Einfach- und Kombinationsinducer wiesen bei gleichem Applikationsmodus keine grossen Unterschiede auf. Nach intraperitonealer Applikation lagen die Wirkungsindices der Inducer bis zur 1:100-Verdünnung im wirksamen Bereich und fielen erst bei der 1:1000-Verdünnung unter den als Grenzwert er-

Abbildung 1: Dosis-Wirkungskurven der Präparate im
Pseudomonas aeruginosa - Infektionsmodell
bei intraperitonealer Anwendung (0,2ml)

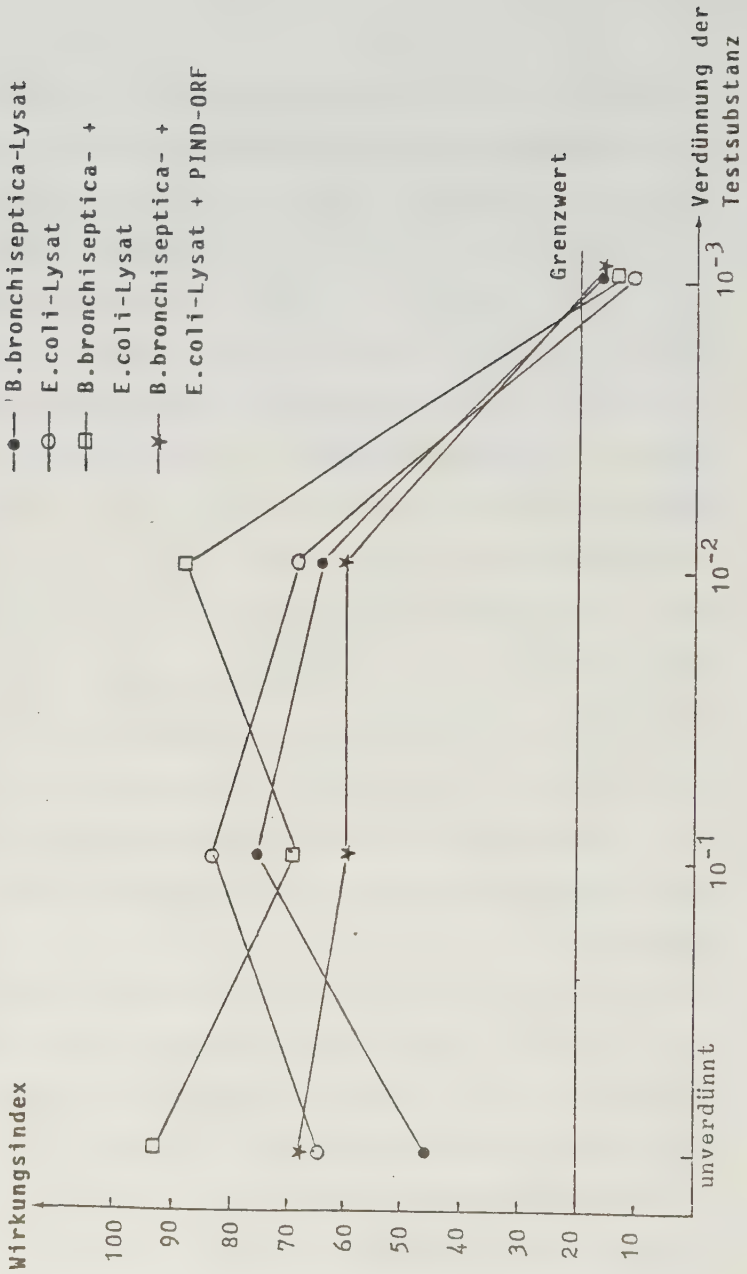
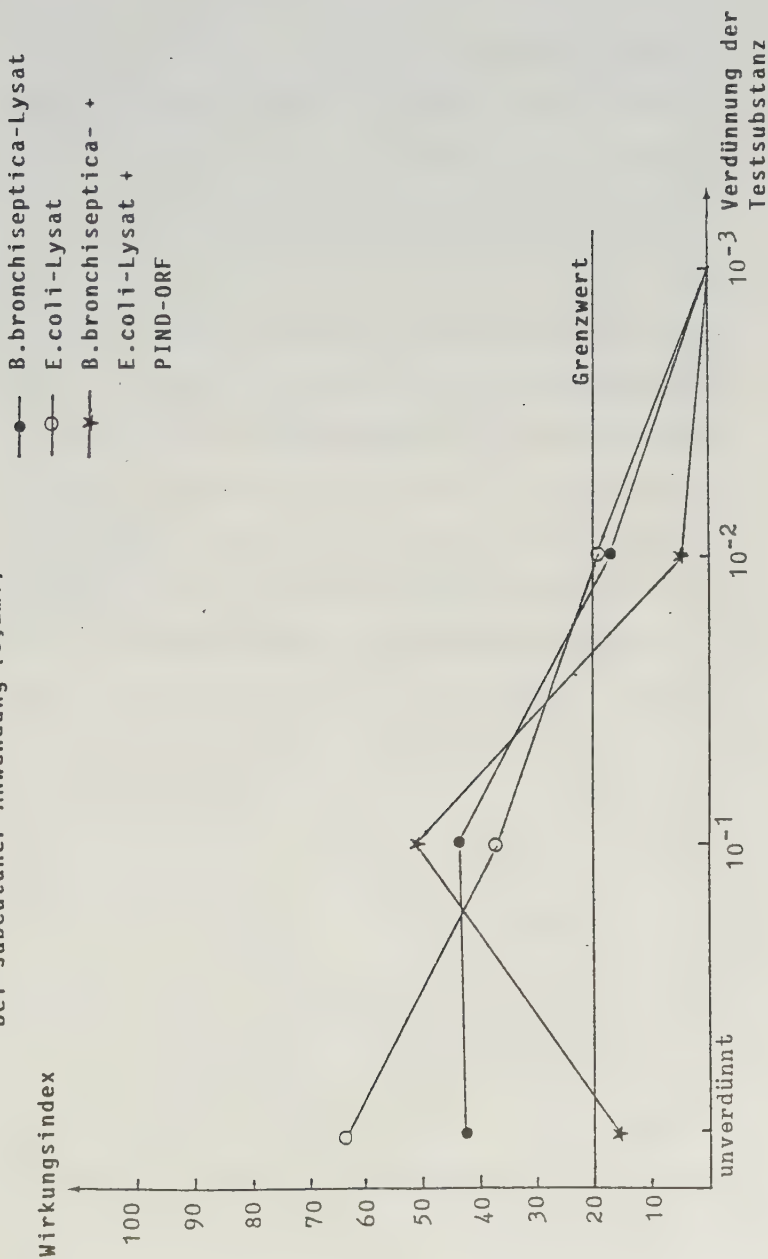


Abbildung 2: Dosis - Wirkungskurven der Präparate
im *Pseudomonas aeruginosa* - Modell
bei subcutaner Anwendung (0,2ml)



rechneten Wirkungsindex 20. Dies bedeutet, daß bei intraperitonealer Applikation alle getesteten Präparate 500 Wirkungseinheiten pro ml besaßen. Nach subcutaner Vorbehandlung der Mäuse mit denselben Inducern waren die Wirkungseinheiten für alle Inducer um das zehnfache niedriger (50 WE pro ml). PIND-ORF wurde allein nicht in die Graphiken aufgenommen, da die Wirkungsindices schon bei unverdünnter Anwendung nicht im signifikanten Wirkungsbereich ($WI < 20$) lagen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Einfach- und Kombinationspräparate in derselben Dosierung (1:100-Verdünnung) vergleichend in verschiedenen Infektionsmodellen geprüft. In dem Pseudomonas-, Listerien- und Aujeszky-Modell wurden Testsubstanz und Infektionskeim intraperitoneal, im Salmonella-Modell oral verabreicht. Die einmalige intraperitoneale Vorbehandlung erfolgte 24 Stunden vor der Testinfektion. Die orale Immunisierung erstreckte sich über 10 Tage vor der Infektion (Zusammenstellung in Tabelle 1).

Im Pseudomonas-Modell erzielten die Bakterien-Lysate die höchste Wirksamkeit. Der Wirkungsindex des E.coli-Lysates betrug 53, der des B.bronchiseptica-Lysates 65. Durch die Kombination der beiden Immunstimulantien erhöhte sich der Wirkungsindex auf 88. Eine einmalige

Tabelle 1: Infektionshemmende Wirkung von Paramunitätsinducern bei einzelner oder kombinierter intraperitonealer Anwendung

Testsubstanz ¹⁾		Wirkungsindex bei verschiedenen Infektionsmodellen (Infektionsdosis 3 bis 5 LD ₅₀)			
		"Pseudomonas" ²⁾	"Listeria" ²⁾	"Aujeszky" ²⁾	"Salmonella" ³⁾
Einfachpräparate	B. bronchiseptica-Lysat	53	26	30	42
	E. coli-Lysat	65	21	30	25
	PIND-ORF	17	n. d.	80	n. d.
Kombinationspräparate	B. bronchiseptica- + E. coli-Lysat	88	37	45	25
	B. bronchiseptica- + E. coli-Lysat + PIND-ORF	57	42	50	0
physiologische Kochsalzlösung (Kontrolltiere)		0	0	0	0

1) Einzel- und Kombinationspräparate erhielten dieselbe Dosis für jede Testsubstanz

2) Inducer und Testkeim wurden intraperitoneal appliziert

3) Inducer und Testkeim wurden oral appliziert

Vorbehandlung mit PIND-ORF war dagegen wirkungslos (Index <20). Interessanterweise erreichte die dreifache Kombination aus den Lysaten und PIND-ORF nur einen niedrigeren bzw. gleich hohen Index (57) als die reinen Lysatpräparate.

Im Listerien-Modell waren die Lysate wesentlich weniger wirksam als im Pseudomonas-Modell. Die Einzelsubstanzen erreichten einen Index von 26 (*B.bronchiseptica*-Lysat) bzw. 21 (*E.coli*-Lysat). Durch die Kombination der Testsubstanzen verbesserte sich die Schutzrate. Das kombinierte Lysatpräparat hatte einen Wirkungsindex 37. Durch Zusatz von PIND-ORF erhöhte sich der Index auf 42.

Die Ergebnisse der Lysate im Aujeszky-Modell entsprachen den Ergebnissen im Listerien-Modell. Die mit *B.bronchiseptica*- und *E.coli*-Lysat vorbehandelten Gruppen erzielten einen Wirkungsindex 30. Bei den mit dem Kombinationspräparat aus *B.bronchiseptica*- und *E.coli*-Lysat behandelten Gruppen erhöhte sich der Index auf 45. PIND-ORF hatte allein einen Wirkungsindex von 80; durch die Kombination mit den Lysaten verschlechterte sich dagegen das Ergebnis deutlich (WI 50).

Die Ergebnisse nach oraler Verabreichung der Inducer im *Salmonella typhimurium*-Modell waren etwas kontro-

vers. Das *B.bronchiseptica*-Lysat erzielte den höchsten Wirkungsindex (42), der weder von dem *E.coli*-Lysat (WI 25), noch von dem Kombinationspräparat aus *E.coli*- und *B.bronchiseptica*-Lysat (WI 25) erreicht wurde. Ungeschützt blieben die oral mit dem Dreifachpräparat vorbehandelten Mäuse.

In den bisherigen Untersuchungen wurden die Testsubstanzen vor der Infektion angewendet. In einer zweiten Versuchsreihe haben wir auch die Wirkung bei einer Applikation nach der Infektion überprüft. Als Testkeime fanden *Pseudomonas aeruginosa* und *Listeria monocytogenes* Verwendung. Die Applikation der Inducer (1:10-Verdünnung) und Testkeime erfolgte intraperitoneal. Einen Überblick über die Ergebnisse im *Pseudomonas*-Modell vermittelt Tabelle 2 und im *Listeria*-Modell Tabelle 3.

Aus den Tabellen wird ersichtlich, daß praktisch kein Unterschied in den Wirkungsindices zwischen den Tiergruppen, die vor und denen die nach der Infektion mit den Testsubstanzen behandelt wurden, festzustellen war. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Zusammensetzung der Präparate. Die beobachteten geringen Schwankungen blieben im Toleranzbereich.

Tabelle 2: Paramunisierende Wirkung von Einfach- oder Kombinationspräparaten, die vor der Testinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa* i.p. appliziert wurden

Infektionsmodell (i.p.)	Testsubstanz	Wirkungsindex bei unterschiedlichem Applikationsmodus	
		einmal 24 h a. inf.	zweimal 24hu.12h a. inf.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3-5 LD ₅₀)	<i>B. bronchiseptica</i> -Lysat	53	45
	<i>E. coli</i> -Lysat	65	50
	<i>B. bronchiseptica</i> - + <i>E. coli</i> -Lysat	88	83
	<i>B. bronchiseptica</i> - + <i>E. coli</i> -Lysat + PIND-ORF	57	n.d.

Tabelle 3: Paramunisierende Wirkung von Einfach- oder Kombinationspräparaten, die vor oder nach der Testinfektion mit *Listeria monocytogenes* i.p. appliziert wurden

Infektionsmodell (i.p.)	Testsubstanz	Wirkungsindex bei unterschiedlichem Applikationsmodus	
		einmal 24 h a. inf.	zweimal 24h a.inf. u. 12h p.inf.
<i>Listeria</i> mono- cytogenes (1-3 LD ₅₀)	<i>B.bronchiseptica</i> -Lysat	26	22
	<i>E.coli</i> -Lysat	21	33
	<i>B.bronchiseptica</i> - + <i>E.coli</i> - Lysat	37	22
	<i>B.bronchiseptica</i> - + <i>E.coli</i> - Lysat + PIND-ORF	42	55

Aus den Ergebnissen aller Infektionsbelastungsmodelle (verwendet wurden alle Daten aus Tabelle 1-3 und Abbildung 1) für die Präparate B.bronchiseptica- und E.coli-Lysat (Abb.3) und den zwei Kombinationspräparaten (Abb. 4) wurde die lineare Regressionsgerade berechnet. Der Verlauf der Regressionsgeraden zeigt, daß beide Präparategruppen in ihrer Wirkungsweise sehr ähnlich sind. Aus der ähnlichen Steigung der Geraden erkennt man, daß in allen Versuchen die Wirkung der Präparate mit steigender Verdünnung in etwa gleichem Maß abgenommen hat. Grundsätzlich bewegte sich aber die Gerade der Einfachpräparate auf einem höheren Niveau, was zumindest in den von uns geprüften Infektionsmodellen auf eine insgesamt höhere Wirkung schließen läßt.

Abbildung 3: Lineare Regression des B.bronchiseptica- und E.coli-Lysates
 berechnet aus den Wirkungsindizes in verschiedenen
 Infektionsmodellen bei i.p. Applikation

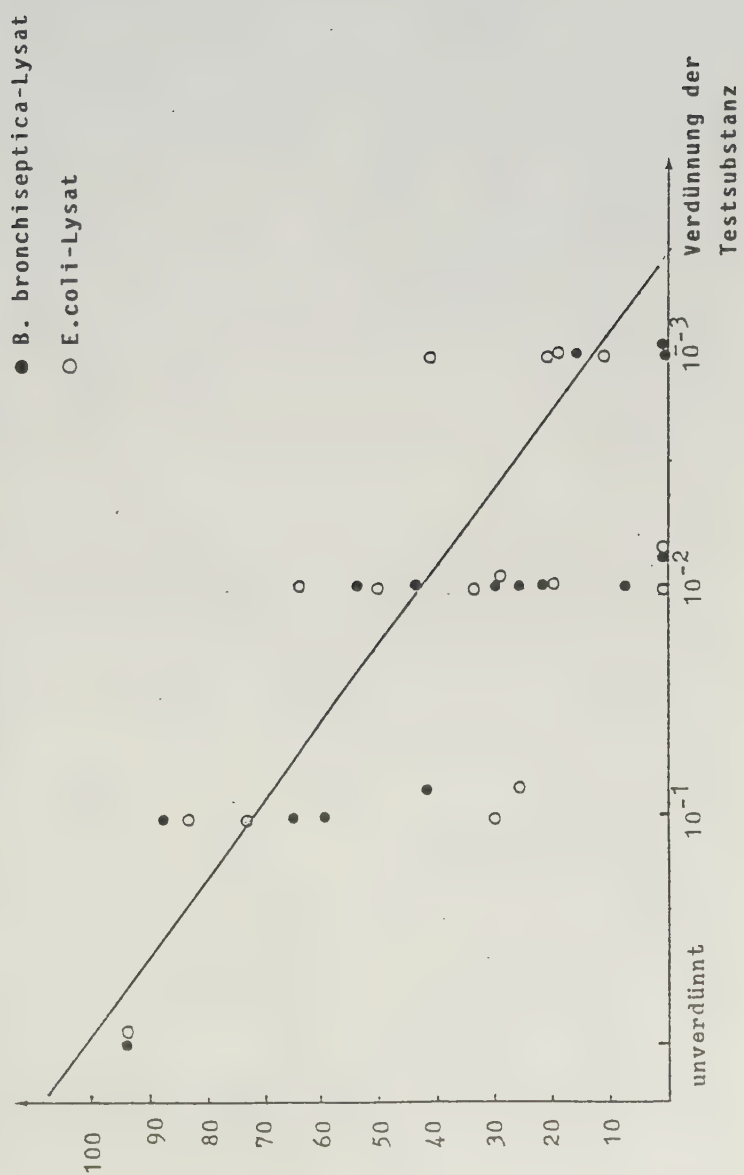
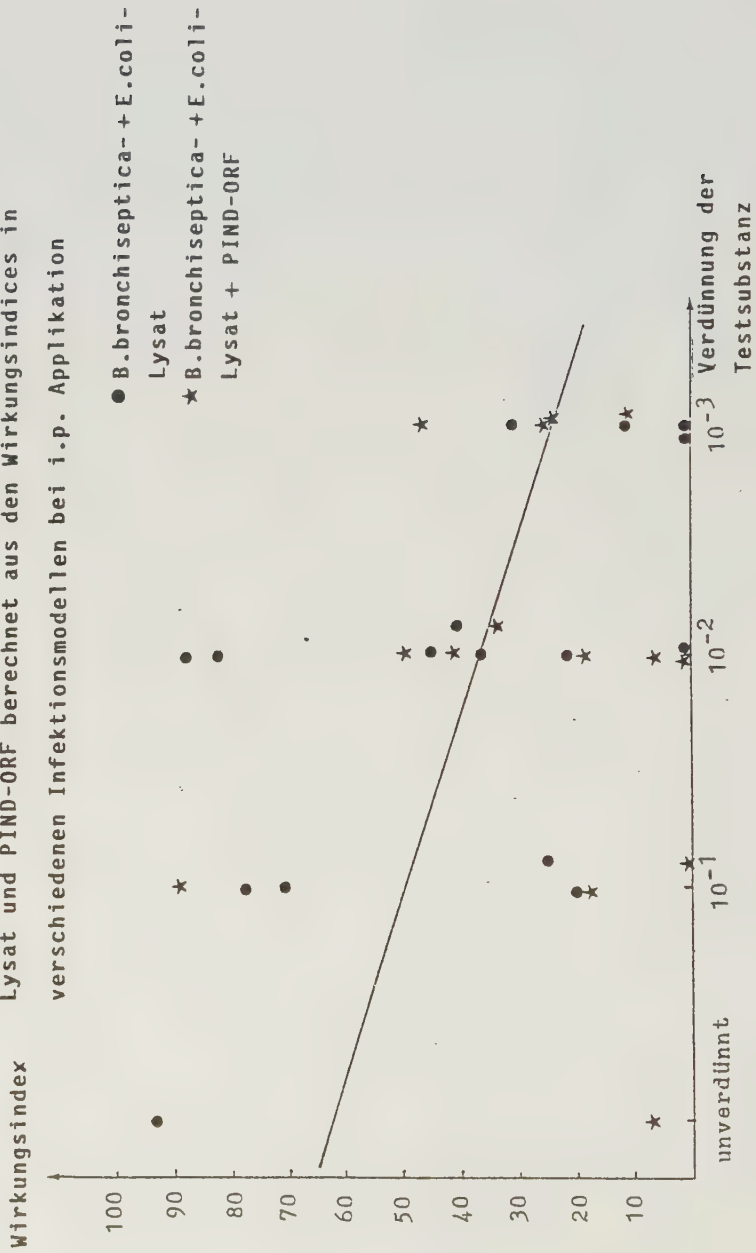


Abbildung 4: Lineare Regression der Kombinationspräparate aus B.bronchiseptica- und E.coli-Lysat bzw. B.bronchiseptica- und E.coli-Lysat und PIND-ORF berechnet aus den Wirkungsindices in verschiedenen Infektionsmodellen bei i.p. Applikation



2.2. Cytotoxizitätstest

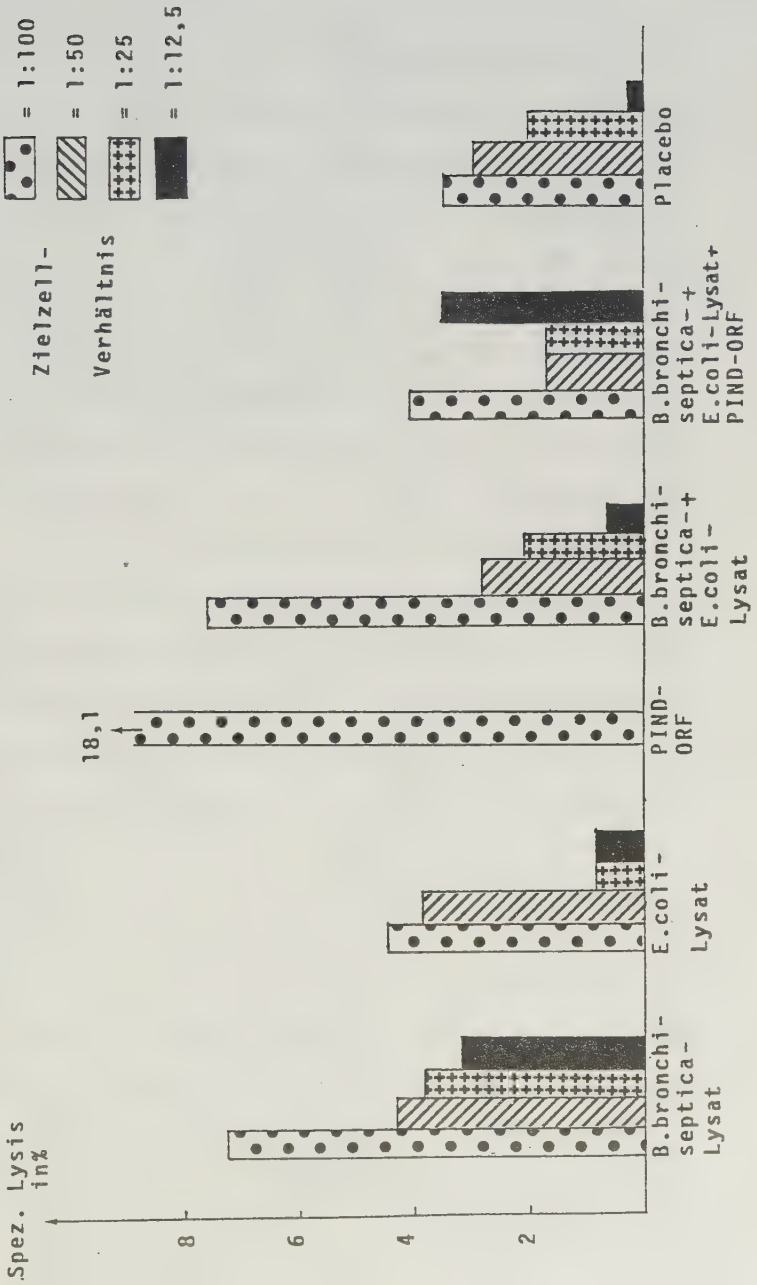
Die Fähigkeit der Testsubstanzen zur Stimulierung der spontanen zellvermittelten Cytotoxizität wurde mit dem Cytotoxizitätstest untersucht. Als Bewertungsgrundlage galt die spezifische Auflösung (Lysis) von Zielzellen durch Effektorzellen (Milz- oder Peritonealexsudat-Zellen) von Mäusen, die gezielt mit den Testsubstanzen *in vivo* vorbehandelt wurden. Die Applikation der Inducer erfolgte intraperitoneal (0,2 ml 1:10). Einen Überblick über die Ergebnisse des Cytotoxizitätstestes vermittelt Tabelle 4 und Abbildung 5.

Die spezifische Lysisrate von YAC-Zellen (Zielzellen) durch Milzzellen (Effektorzellen) von Mäusen, die mit Placebo vorbehandelt wurden (Negativ-Kontrolle) lag zwischen 0,2 und 3,5% je nach Effektor-Zielzellen-Verhältnis. Die Poly I:C-Gruppe (Positiv-Kontrolle) erreichte eine Lysisrate von 22% (Effektor-Zielzellen-Verhältnis 1:100) und 6,3% (Effektor-Zielzellen-Verhältnis 12,5:1). Die Wirkung der Testsubstanzen zeigte dagegen deutlich niedrigere Werte. Nur mit der Applikation von B.bronchiseptica-Lysat, PIND-ORF oder der Kombination aus B.bronchiseptica- und E.coli-Lysat wurde eine Steigerung gegenüber der Negativ-Kontrolle erzielt. Die Lysisrate lag in dieser Gruppe etwa doppelt bzw. dreimal so hoch wie bei der Negativ-Kontrolle.

Tabelle 4: Cytotoxizität der Milzzellen von Mäusen, die mit bakteriellen Lysaten und PIND-ORF allein oder kombiniert vorbehandelt wurden

Testsubstanz	Vorbehandlung der Effektor- zellen	Spezifische Lysis (in%) bei Effektor- Zielzell-Verhältnis von			
		100:1	50:1	25:1	12,5:1
B.bronchiseptica-Lysat	in vivo 0,2 ml i.p. 24h vor der Milzzell- präparation	7,3	4,3	3,8	3,2
E.coli-Lysat		2,4	1,9	0,8	0,8
PIND-ORF		18,1	n.d.	n.d.	n.d.
B.bronchiseptica- + E.coli- Lysat		7,6	2,7	2,1	0,5
B.bronchiseptica- + E.coli- Lysat + PIND-ORF		4,0	1,6	1,6	3,5
Placebo (Kontrolle)		3,5	2,9	2,1	1,9

Abbildung 5: Cytotoxizität der Milzzellen von Mäusen, die mit bakteriellen Lysaten und PIND-ORF allein oder kombiniert intraperitoneal vorbehandelt wurden



2.3. Chemilumineszenztest

Im Chemilumineszenztest wurde die Phagozytoserate der Peritonealmakrophagen von mit Inducer vorbehandelten Mäusen gemessen. Die Hydrolysate aus *B.bronchiseptica*, *E.coli*, sowie die Kombinationspräparate aus *B.bronchiseptica*, *E.coli* und PIND-ORF wurden 24 Stunden vor der Entnahme des Peritonealexsudates (0,2 ml; 1:10) verabreicht. Die von dem an das Chemilumineszenzgerät angeschlossenen Computer aufgezeichneten Kurven von den in der Zeiteinheit (60 min) gezählten Lichtimpulsen (CpM) sind in Abbildung 6-8 wiedergegeben.

Den höchsten Phagozytoseindex hatten Peritonealmakrophagen, die von den mit *E.coli*-Lysat vorbehandelten Mäusen stammten (756117×10^3 CpM). Nach Vorbehandlung mit dem Kombinationspräparat aus *B.bronchiseptica*- und *E.coli*-Lysat war der Phagozytoseindex um das dreifache niedriger (264220×10^3 CpM). Den schwächsten Index hatten Peritonealmakrophagen von Mäusen, die mit dem Kombinationspräparat aus *B.bronchiseptica*- und *E.coli*-Lysat und PIND-ORF (115220×10^3 CpM) oder mit dem *B.bronchiseptica*-Lysat (92961×10^3 CpM) vorbehandelt wurden. Der Phagozytoseindex der Peritonealmakrophagen von unvorbehandelten Kontrolltieren lag sowohl bei der Vormessung (171×10^3 CpM), als auch

Abbildung 6: Phagozytoserate im Chemilumineszenztest bei Peritonealmakrophagen von Mäusen, die mit *B.bronchiseptica*- oder *E.coli*-Lysat intraperitoneal vorbehandelt wurden

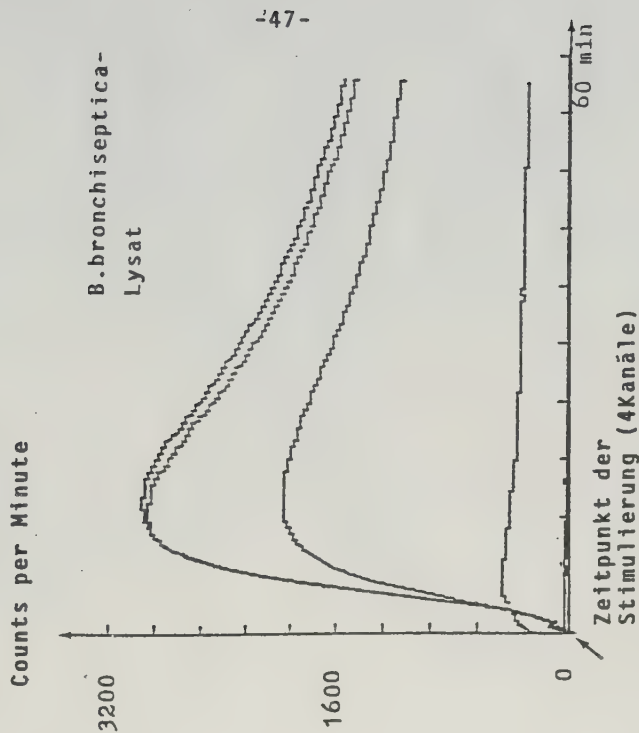
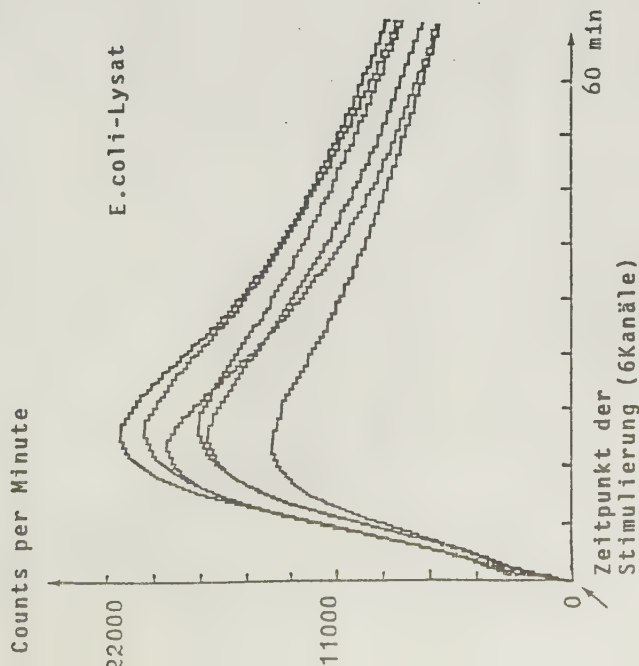


Abbildung 7: Phagozytoserate im Chemilumineszenztest bei Peritonealmakrophagen
 von Mäusen, die mit Kombinationspräparaten intraperitoneal
 vorbehandelt wurden

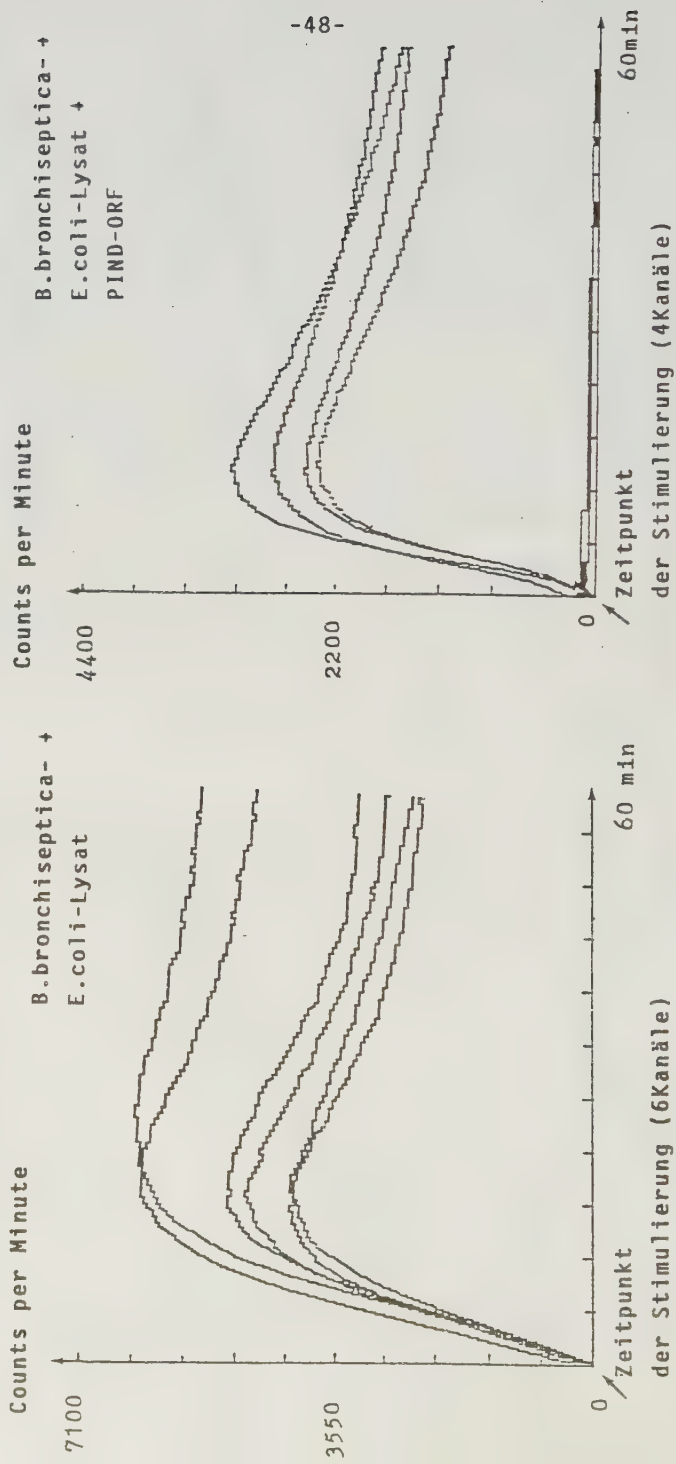
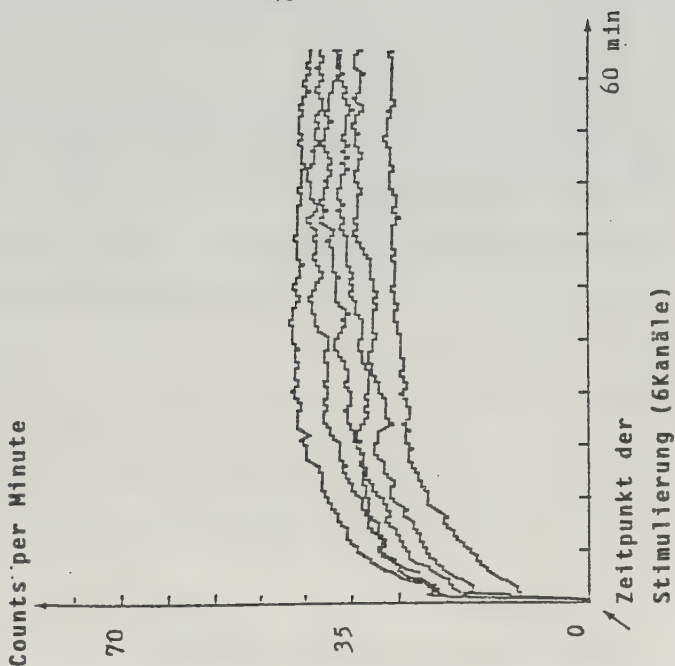
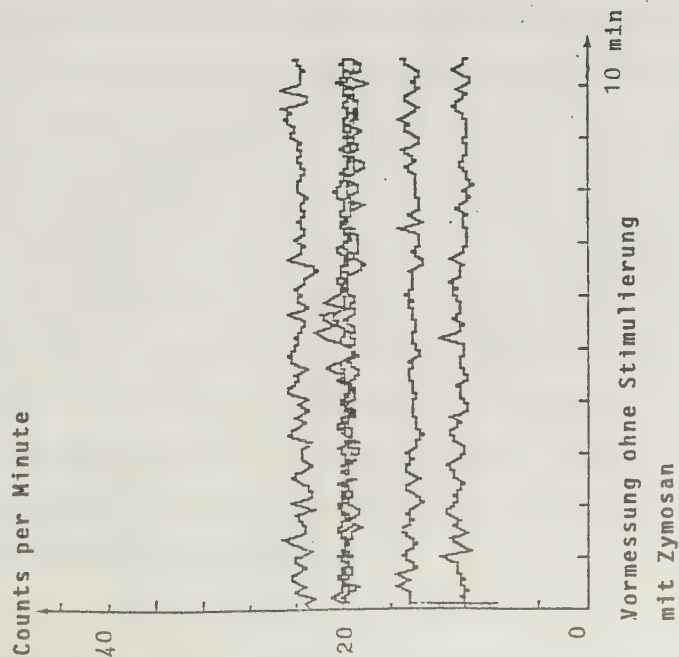


Abbildung 8: Phagozytoserate im Chemilumineszenztest bei Peritonealmakrophagen
von Mäusen, die nicht vorbehandelt wurden (Kontrolltiere)



bei der mit Zymosan stimulierten Hauptmessung (2159×10^3 CpM) deutlich niedriger.

Aus dem Verlauf der Kurven wird der zeitliche Verlauf der Phagozytose ersichtlich. Bei allen Präparaten wurde nach der Stimulierung ein steiler Anstieg der Phagozytose verzeichnet, der nach etwa 15 Minuten den Peak erreichte. Bei den aus unvorbehandelten Kontrolltieren gewonnenen Phagozyten hingegen blieb die Kurve nach einem kurzen Anstieg auf einem niedrigen Plateau.

2.4. Indirekter Plaque-Reduktionstest

Für den Serum-Interferonnachweis wurden im indirekten Plaque-Reduktionstest Mäuse mit den Immunstimulantien zweimal im Abstand von 24 Stunden behandelt (0,5 ml i.p.). Die Dosis der Testsubstanzen betrug in etwa 1/5 der vorausgegangenen Untersuchungen, da bei zweimaliger Applikation Unverträglichkeiten auftraten. Anschließend wurden im Serum 8, 24, 48 und 96 Stunden post applicationem in einem in vitro-Zellsystem in vivo gebildetes Interferon nachgewiesen. Die Ergebnisse waren aber mit Ausnahme von PIND-ORF bei allen Substanzen negativ. Weder im Serum der mit den Einzelpräparaten B.bronchiseptica- und E.coli-Lysat noch bei den mit Kombinationspräparaten vorbehandelten

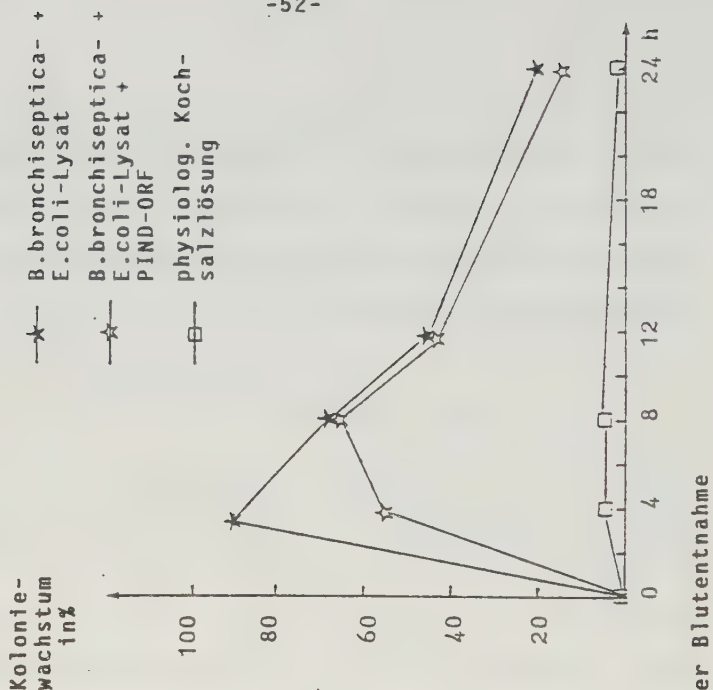
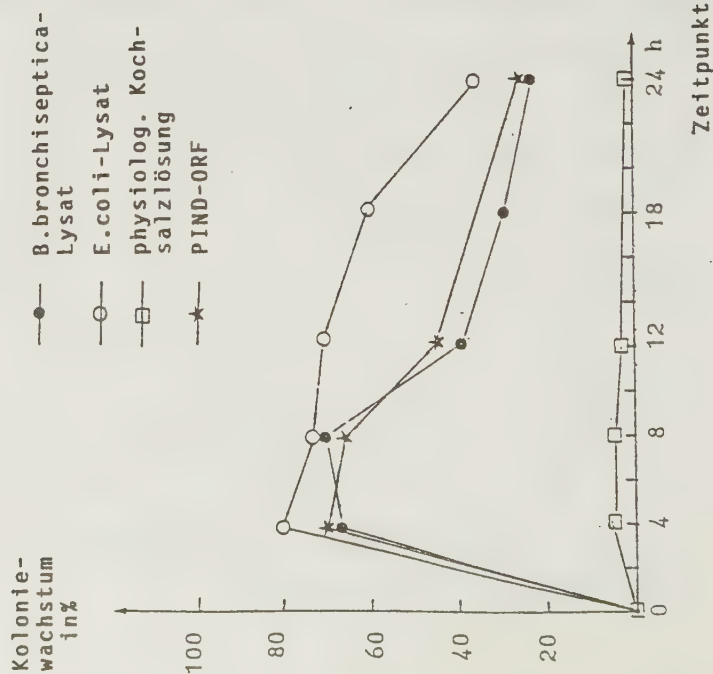
Mäusen konnte der Nachweis von Interferon erbracht werden. Dagegen hemmte z.B. Serum von Mäusen, die mit Newcastle Disease-Virus vorbehandelt wurden, noch in der Verdünnung von 1:16 zu 82% die Vermehrung des Testvirus in der Zellkultur.

2.5. Colony stimulating-Test

Aktivierete T-Zellen im Serum sezernieren den sog. colony stimulating factor, der die Stammzellen im Knochenmark zur Proliferation und Differenzierung anregt. Der CSF-Gehalt im Serum von Mäusen, die mit B.bronchi-septica- oder E.coli-Lysat, bzw. Kombinationspräparaten vorbehandelt worden sind, ist in der Abbildung 9 zusammengefaßt. Der CSF wurde im Einzelnen 4, 8, 12, 18 und 24 Stunden nach der Behandlung bestimmt.

Aus den Kurvenverläufen wird ersichtlich, daß bereits 4 Stunden nach der Applikation der Inducer die höchsten CSF-Werte im Serum der Mäuse nachzuweisen sind. Anschließend kommt es zu einem langsamen Abfall der Werte. Serum, daß 24 Stunden nach der Paramunisierung entnommen wurde, hatte im Vergleich zu den Kontrollseren immer noch einen deutlich stimulierenden Effekt auf das Koloniewachstum. Unterschiede in der stimulierenden Wirkung zwischen den verschiedenen Testsubstanzen waren nicht festzustellen.

Abbildung 9: Zeit - Wirkungskurve im Test mit Stimulierung des colony-stimulating-factors durch Einzel- bzw. Kombinationspräparate



D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden am Beispiel bakterieller Lysate und einem strahleninaktivierten Virus (PIND-ORF) die paraspezifische Wirkung von Kombinationsinducern im Vergleich zu den entsprechenden Einfachinducern untersucht. Dabei erzielte der Einfachinducer bei gleicher Dosierung einen besseren Wirkungsindex bzw. zumindest die gleichen Wirkungseinheiten wie der Kombinationsinducer. Bei den verschiedenen Einfachinducern gab es aber deutliche Wirkungsunterschiede in den Infektionsmodellen; z.B. hatte PIND-ORF die beste Wirksamkeit im Aujeszky-Modell oder B.bronchiseptica-Lysat im Salmonella-Modell. Der Kombinationsinducer erzielte zwar nicht die höchsten Wirkungsindices, dafür war aber bei Berücksichtigung aller Testinfektionen die Breitenwirkung besser. Die Indices des Kombinationspräparates lagen nach intraperitonealer Applikation in allen Infektionsmodellen in einem mittleren Bereich, während die Wirksamkeit der Einfachinducer von sehr gut wirksam bis unwirksam variierte.

Die vorliegenden Ergebnisse beziehen sich erstmals auf die Wirkung einer Kombination aus bakteriellen und viralen Immunstimulantien. Gerade die Verbindung von bakteriellen und viralen Präparaten ist besonders interessant, da zwischen diesen beiden Präparategruppen Unterschiede in der paraspezifischen Wirkung bestehen (ADLER, 1985; BRUNNER, 1983). Die Bakterienlysate, wie z.B. das E.coli- oder B.bronchiseptica-Lysat, stimulieren stärker die an der Abwehr von bakteriellen Infektionen beteiligten Mechanismen und umgekehrt, die viralen Präparate, wie z.B. PIND-AVI oder PIND-ORF, mehr die für die Abwehr von Virusinfektionen bedeutsamen Zellsysteme. Bei der weiten Verbreitung der Mischinfektionen bei Nutz- und Heimtieren gehört deshalb sicher Immunstimulantien, die sowohl gegen bakterielle als auch virale Infektionen wirksam sind, die Zukunft. Die vorliegenden Untersuchungen beweisen, daß mit Kombinationspräparaten dieses Ziel erreicht werden kann. PIND-ORF war z.B. im Pseudomonas-Modell unwirksam; durch die Kombination mit den Lysaten wurde dagegen eine signifikante paramunisierende Wirkung nachgewiesen. Auf der anderen Seite konnte der Wirkungsindex der Lysate im Aujeszky-Modell durch die Kombination mit PIND-ORF um das zwei- bis dreifache verbessert werden.

Alle bisherigen Erfahrungen mit Kombinationsinducern basieren auf Untersuchungen mit bakteriellen Komponenten z.B. Lysaten, hitzeinaktivierten Keimen etc. (RAETIG, 1976; GIRARD und FLEURY, 1979; PUIGDOLLERS, 1980; LOSA, 1984). Ein Teil dieser Präparate wurde für den humanmedizinischen Gebrauch zugelassen (Broncho-Vaxom^R, IRS 19^R, Symbioflor I^R, Symbioflor II^R, Paspas^R), obwohl die Prüfungen sich nur auf das Gesamtpräparat bezogen. Es gibt aber nicht nur Ergebnisse über additive (SPREAFICO, 1985; FUDENBERG, 1984), sondern auch über antagonistische Wirkungen von bakteriellen Kombinationen (SPREAFICO, 1980, 1985). Die Kombination möglichst vieler bakterieller Substanzen ohne fundierte Wirksamkeitsuntersuchungen garantiert nicht unbedingt auch eine entsprechende Potenzierung der immunstimulierenden Eigenschaften (NOUGAYREDE, 1980). Es reicht deshalb bei der Entwicklung eines Kombinationspräparates nicht aus, nur das Gesamtpräparat und nicht auch seine einzelnen Komponenten zu überprüfen. Bei Verwendung nicht abgestimmter Komponenten kann die Wirksamkeit des Kombinationspräparates durch die antagonistische Wirkung einzelner Bestandteile verschlechtert werden. Unter Umständen wären für dieselbe Wirkung oft viel weniger Komponenten erforderlich.

Da Einfachpräparate in einzelnen Infektionsmodellen eine bessere Wirksamkeit hatten, kann als Beweis dafür gewertet werden, daß die empirische Kombination von möglichst vielen Komponenten nicht unbedingt sinnvoll ist. Dafür sprechen neben den Ergebnissen der Wirksamkeitsbestimmung auch die zum Teil starken Unverträglichkeiten der bakteriellen Präparate in hoher Dosierung bei parenteraler Anwendung. In der Humanmedizin werden deshalb die Kombinationsinducer oral angewendet. Die orale Verabreichung bringt nicht nur ein geringeres Schadensrisiko, sondern auch den Vorteil, daß lokale unspezifische Abwehrkräfte an den Schleimhäuten stimuliert werden. So kann nach oraler, paraspezifischer Immunstimulierung eine erhöhte, körpereigene Abwehr an den Schleimhäuten des Respirationstraktes (PUIGDOLLERS et al., 1980; LOSA und MAESTRONI, 1984; AHRENS, 1984; KELLER, 1984; GIRARD und FLEURY, 1979) oder an den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden (RAETTIG, 1982a, 1982b; SCHULZE, 1973; SCHLEWINSKI, 1971; BLOMGREN, 1979, 1980; JARSTRAND, 1982; RUDENT, 1979). In unseren Untersuchungen war es möglich, durch orale Applikation eines Bakterienlysates die körpereigene Abwehr der Darmschleimhaut so zu steigern, daß die Überlebensrate gegenüber einer *Salmonella typhimurium*-Infektion

signifikant erhöht war. RAETTIG schützte Mäuse mit einem Oralpräparat aus hitzeinaktivierten Bakterien gegen eine Columbia-SK-Virus-Infektion. Interessanterweise war unabhängig vom Lokalisationsort des Tumors auch bei der Bekämpfung von Tumorkrankheiten die lokale Applikation der Immunstimulantien (bakterielle Spaltprodukte) in den Tumor besser als die parenterale Verabreichung (OETTGEN et al., 1976; MORIYASU et al., 1982; KONDO et al., 1982).

Bisher liegen relativ wenig experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit von Immunstimulantien bei lokaler (oral bzw. nasal) Applikation vor. Einer der Hauptgründe ist das Fehlen von geeigneten Tiermodellen. Die orale oder nasale Applikation ist bei kleinen Versuchstieren schwer zu standardisieren. Der Einsatz einer Schlundsonde ermöglicht zwar die individuelle Dosierung; die Belastung für das Versuchstier ist aber relativ groß. Bei mehrmaliger Applikation kann man nicht ausschließen, daß über Mikroläsionen an der Schleimhaut die Resorptions- bzw. Persorptionsverhältnisse verändert werden. Bei der Applikation über das Trinkwasser oder Futter ergeben sich individuelle Dosierungsprobleme. Deshalb wurde sehr häufig das "Peritoneal-Modell" (intraperitoneale Applikation von

Immunstimulantien und Testkeim) für die Bestimmung der lokalen Wirkung von Immunstimulantien herangezogen (vgl. Schrifttum). Die bisherigen Daten über die Zellsysteme im Peritoneum und in der Darmschleimhaut zeigen aber, daß die Ergebnisse im "Peritoneal-Modell" nicht unbedingt auf das "Schleimhaut-Modell" übertragbar sind. Die Entwicklung geeigneter Versuchsmodelle zur Wirksamkeitsprüfung lokal anzuwendender Paramunitätsinducer ist deshalb ein vordringliches Problem.

In unseren Untersuchungen prüften wir auch die paraspezifische Wirkung von Einfach- und Kombinationspräparaten über die Phagozytoseaktivität der Peritonealmakrophagen, die Bildung von Monokinen und Interferon, sowie über die Steigerung der Cytotoxizität von NK-Zellen. Mit Ausnahme der Ergebnisse im Phagozytose- und CSA-Test, wo Einfach- und Kombinationspräparate gleich wirksam waren, blieben die Einfachinducer den Kombinationsinducern überlegen. Im Cytotoxizitätstest und Interferonnachweis war sogar nur PIND-ORF allein positiv, während das Kombinationspräparat, das PIND-ORF in gleicher Dosis enthielt, negativ blieb. Man kann also annehmen, daß die Lysate in diesem Modell einen suppressiven Effekt auf die Wirkung des PIND-ORF hatten. Für die Verwendung in der Praxis wäre es des-

halb wichtig, nach einer Komponente für den Kombinationsinducer zu suchen, die auf die NK-Zellaktivität und die Seruminterferonbildung stimulierend wirkt. Die Frage, warum die positive Wirkung von PIND-ORF durch die gleichzeitige Verabreichung von Lysaten unterdrückt wird, können wir aufgrund der bisherigen Ergebnisse noch nicht beantworten.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Entwicklung von Kombinationsinducern zur Stimulierung des unspezifischen Anteils der körpereigenen Infektabwehr sinnvoll ist. Die bisherigen Erfahrungen über mögliche Kombinationen sind sehr begrenzt. Es wäre verfrüht, die von uns geprüfte Kombination aus bakteriellen Lysaten und PIND-ORF als optimal anzusehen. Aus der Vielfalt der in Frage kommenden biologischen und synthetischen Präparate ergibt sich die Möglichkeit zahlreicher Varianten, deren Überprüfung eine Herausforderung der Zukunft sein wird.

E ZUSAMMENFASSUNG

In vergleichenden Untersuchungen bei Mäusen wurde die immunstimulierende (paramunisierende) Wirkung von Einfach- und Kombinationspräparaten aus Lysaten von *B. bronchiseptica* und *E.coli*, sowie dem viralen Inducer PIND-ORF geprüft. Die Wirksamkeitsbestimmung erfolgte in bakteriellen bzw. viralen Infektionsmodellen und durch den Nachweis der Phagozytose (Chemilumineszenztest), NK-Zellaktivität (Cytotoxizitätstest), Interferonbildung (indirekter Plaque-Reduktionstest) und Stimulierung der CSA (colony stimulating-Test). Die Applikation der Inducer wurde intraperitoneal, subcutan oder oral vorgenommen.

Im *Pseudomonas*-Modell erzielten sowohl die Einfachinducer (*B.bronchiseptica*-, *E.coli*-Lysat), als auch der Kombinationsinducer (*B.bronchiseptica*- und *E.coli*-Lysat und PIND-ORF) bei intraperitonealer Applikation 500 und bei subcutaner Applikation 50 Wirkungseinheiten. In den Infektionsmodellen "Aujeszky" und "Salmonella" erreichte dagegen der Kombinationsinducer nicht die Höchstwerte der Einfachinducer. Die paraspezifische Wirkung der verschiedenen Einfachinducer hing aber sehr stark vom Infektionsmodell ab, während sich die Wirkungsindices des Kombinationsinducers, unabhängig von In-

fektionsmodell, im mittleren Wirksamkeitsbereich bewegten. Einfach- und Kombinationspräparate stimulierten gleichermaßen die Phagozytoseaktivität bei Peritonealmakrophagen, sowie die Bildung von CSF im Serum. Serum- Interferon konnte nur nach Stimulierung mit PIND-ORF nachgewiesen werden. Eine erhöhte NK-Zellaktivität in der Milz hatten nur Mäuse, die mit B.bronchiseptica-Lysat oder PIND-ORF intraperitoneal vorbehandelt wurden, nicht aber die mit den Kombinationsinducern stimulierten Mäuse.

Comparative studies about the paraspecific stimulation of the immune system (paramunization) with single- and combined preparations of bacterial lysates and Parapoxvirus

SUMMMARY

In comparative studies with mice the immune-stimulating (paramunizing) effect of single- and combined preparations of lysates of *B.bronchiseptica* and *E.coli* or the viral inducer PIND-ORF was tested. The paramunizing properties were investigated in bacterial and viral infection models and by their ability to enhance phagocytosis (chemiluminescence-test), NK-cell-activity (cytotoxicity-test), production of interferon (indirect plaque-reduction-test) and stimulation of CSA (colony stimulating-test). The inducers were administered on the intraperitoneal, subcutaneous or oral route.

In the *Pseudomonas*-model the single- (*B.bronchiseptica*-, *E.coli*-lysate) as well as the combined (*B.bronchiseptica*- and *E.coli*-lysate and PIND-ORF) inducers reached the same level of stimulating potency with intraperitoneal (500 units) or subcutaneous (50 units) administration. In the infection models "Aujeszky" and "Salmonella" the combined inducer could not achieve the high levels of the single inducers. The paramunizing effect of the ly-

sates and PIND-ORF alone was dependent on the infection model; on the other hand the indices of the combined inducers in all infection models stayed in the middle of the efficiency range.

Single- and combined inducers stimulated equally the phagocytosis of peritoneal macrophages and the colony stimulating activity. The production of serum-interferon could only be proved after the stimulation with PIND-ORF. An increase of the NK-cell-activity was only to be found in mice that received B.bronchiseptica-lysate or PIND-ORF intraperitoneally.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. ADLER, J., 1985:
Experimentelle Untersuchungen über die paramunisierenden Eigenschaften von Bakterienlysaten in bakteriellen Infektionsmodellen bei der Maus.
Vet. Med. Diss., München, 1985.
2. AHRENS, J., M. WIEDENBACH, 1984:
Die Wirksamkeit des Immunstimulators Broncho-Vaxom.
Schweiz. Med. Wschr. 114, 932.
3. ALLEN, R.C., L.D. LOOSE, 1976:
Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 (1), 245.
4. BARTIZAL, K.F., C. SALKOWSKI and E. BALISH, 1983:
The influence of a gastrointestinal microflora on natural killer cell activity.
J. Reticuloendothel. Soc. 33, 381.
5. BARTLETT, G.L., J.W. KREIDER and D.M. PURNELL, 1980:
Treatment of cancer using Corynebacterium parvum: similarity of two preparations in four animal tumor models.
Cancer, 46, 685.
6. BLOKSMA, N., H. ETTEKOVEN, F.M. HOFHUIS, L.VAN NOORLE-JANSEN, M.J. DE REUVER, J.G. KREEFTENBERG and J.M. WILLERS, 1981:
Effects of Lactobacilli on parameters of non-specific resistance of mice.
Med. Microbiol. Immunol. 170, 45.

7. BLOMGREN, H., STRENDER, L-E. and F. EDSMYR, 1979:
Bestatin treatment and the peripheral lymphocyte population in cancer patients. In: Cancer Chemo- and Immunopharmacology. Recent Results in Cancer Research. Editor G. Mathe. Springer Verlag. 75, 133.
8. BLOMGREN, H., STRENDER, L-E. and F. EDSMYR, 1980:
Changes of the blood lymphocyte population in cancer patients treated with Bestatin, a new immunomodulator. A phase I study. Biomedicine.
The Eur. J. Clin. Biol. Res., 32, 178.
9. BRADLEY, T.R., METCALF, D., 1966:
The growth of mouse bone marrow cells in vitro.
J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287.
10. BRUNNER, R., 1983:
Neue Versuchstiermodelle zum Nachweis einer medikamentellen Stimulierung der unspezifischen, körpereigenen Abwehr.
Vortrag zum XXII Welttierärztekongress in Perth.
11. BÜTTNER, M., 1984:
Spontane zellvermittelte Cytotoxizität.
Tierärztliche Umschau 39 (3), 214.
12. BUUS, M., 1986:
Untersuchungen über die prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit von zwei Paramunitätsinducern (Bayferon^R- Bayer, Duphamun^R-Salabury) bei der enzootischen Bronchopneumonie der Jungrinder.
Vet. Med. Diss. Gießen, 1986.

13. BUUS, M., GRÜNDER, H.D., 1986:
Paramunitätsinducer - Untersuchungen über die prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit von zwei Paramunitätsinducern (Bayferon^R Bayer, Duphamun^R-Salabury) bei der enzootischen Bronchopneumonie der Jungrinder.
Vet. 3, 6.
14. CAVALLI-STORZA, 1969:
Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Stuttgart, 1969.
15. CHEDID, L., 1983:
Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmalogical mediators.
Microbiol. Immunol. 27 (9), 723.
16. DICKNEITE, G., SCHORLEMMER, H.U. and H. H. SEDLACEK, 1984:
Chronic bacterial infection models for BRM Screening.
Behring Inst. Mitt. 74, 174.
17. DOMKE, J., KIRCHNER, H., 1985:
Interferone: Biologische Grundlagen der klinischen Anwendung.
Deutsches Ärzteblatt 82 (37), Ausgabe B
18. FARRELL, H.E., P.G. HOLT and G.R. SHELLAM, 1985:
Regulation of natural killer cell activity and interferon production in the rat lung following aerosol challenge.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 78, 318.

19. FISHEL, C.W., D.G. HALKIAS, T.W. KLEIN and A. SZENTIVANYI, 1976:
Characteristics of cells present in peritoneal fluids of mice injected intraperitoneally with *Bordetella pertussis*.
Infect. Immun. 13 (1), 263.
20. FREEDMAN, V.H., T.A. CALVELLI, S. SILAGI and S.C. SILVERSTEIN, 1980:
Macrophages elicited with heat-killed *Bacillus Calmette- Guerin* protect C5BL/ 6J mice against a syngeneic melanoma.
J. Exp. Med. 152, 657.
21. FUDENBERG, H.H., H.D. WHITTEN, 1984:
Immunostimulation: synthetic and biological modulators of immunity.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24, 147.
22. GALELLI, A., LEFRANCIER, P. and L.CHEDID, 1984:
Colony-stimulating activity induced by synthetic muramyl peptides: Variation with chemical structure and association with anti-infectious activity.
Inf. and Immun. 46 (2), 495.
23. GARDNER, P.S., R. MCGUCKIN, A:J: BEALE and R. FERNANDES, 1970:
Interferon and respiratory syncytical virus.
Lancet 1, 574.
24. GATENBY, P., A. BASTEN, 1980:
A mouse model for immunotherapy of osteosarcome II. *Corynebacterium parvum* therapy.
Cancer Immunol. Immunther. 8, 103.

25. GERMAIN, R.N., R.M. WILLIAMS and B. BENACERRAT, 1975:
Specific and nonspecific antitumor immunity:
II. Macrophage-mediated nonspecific effector-
activity induced by BCG and similar agents.
J. Natl. Cancer Inst. 54, 709.
26. GIBSON, P.R., D.P. JEWELL, 1985:
The nature of the natural killer cells of
human intestinal mucosa and mesenteric
lymph node.
Clin. Exp. Immunol. 61 (1), 160.
27. GIBSON, P.R., E.L. DOW, W.S. SELBY, R.G. STRICK-
LAND and D.P. JEWELL, 1984:
Natural killer cells and spontaneous cell-
mediated cytotoxicity in the human intes-
tine.
Clin. exp. Immunol. 56, 438.
28. GIRARD, J.P., S. FLEURY, 1979:
Vergleichende Untersuchungen der Lympho-
zytenreaktion in vitro auf Levamisol und
ein Bakterienlysat.
Medicine et Hygiène 37, 2519.
29. GLASGOW, L.A., J.L. CRANE, C.J. SCHLEUPNER, E.R.
KERN, J.S. YOUNGNER and D.S. FEINGOLD, 1979:
Enhancement of resistance to murine osteo-
genic carcinoma in vivo by an extract of
Brucella abortus (Bru-Pel): association
with activation of reticuloendothelial sys-
tem macrophages.
Infect. Immun. 23, 19.

30. GOLDER, J.P., W.F. DOE, 1983:
Isolation and preliminary characterisation
of human intestinal macrophages.
Gastroenterology 84, 795.
31. HEISE, E.R., R.S. WEISER, 1969:
Factors in delayed sensitivity: lymphocyte
and macrophage cytotoxins in the tuberculin
reaction.
J. Immunol. 103, 570.
33. HERBERMAN. R.B., 1982:
NK-cells and other natural effector cells.
Acad. Press, Inc., New York, pp. 1566.
34. HERBERMAN, R.B., M.E. NUNN and D.H. LAVRIN, 1975:
Natural cytotoxic reactivity of mouse-
lymphoid cells against syngeneic and allo-
geneic tumors: I. Distribution of reactivity
and specificity.
Int. J. Cancer 16, 216.
35. HIBBS, J.B., 1975:
Heterocytolysis by macrophages activated by
Bacillus Calmette-Guerin: Lysosome exocyto-
sis into tumor cells.
Science 184, 468.
36. HILL, D.A., S. BARON and R.M. CHANOCK, 1969:
Sensitivity of common respiratory viruses
to an interferon inducer in human cells.
Lancet 2, 187.
37. HOGAN, P.G., A.J. HAPEL and W.F. DOE, 1985:
Lymphokine-activated and natural killer
cell activity in human intestinal mucosa.
J. of Immunol. 135 (3), 1731.

38. IDRIS, J., 1981:
Neue Waffe gegen Virusleiden: Einsatz von
Immunomodulatoren. Int. Immunologenkongreß
in Paris 1980 (III).
Selecta 11, 198.
39. ISHII, Y., H. YAMAOKA, T. KENTARO and K. KIKUCHI,
1976:
Inhibition of tumor growth in vivo by macro-
phages from rats treated with a streptococ-
cal preparation, OK 432.
Gann, 67, 115.
40. JARSTRAND, C., H. BLOMGREN, 1982:
Increased granulocyte phagocytosis after oral
administration of Bestatin, a new immunomo-
dulator.
J. Clin. Immunol. 7, 115.
41. JOHNSON, J.D., W.L. HAND, N.L. KING and C.G. HUGHES,
1975:
Activation of alveolar macrophages after lo-
wer respiratory tract infection.
J. of Immunol. 115 (1), 80.
42. KAI, S.J., J. TANAKA, K. NOMOTO and H. TORISU, 1979:
Studies on the immunopotentiating effects
of a streptococcal preparation OK 432.
I. Enhancement of T-cell-mediated immune
responses of mice.
Clin. Exp. Immunol. 37, 98.
43. KATO, J., S. KOBAYASHI, T. YOKOKURA and M. MUTAI,
1981:
Antitumor activity of Lactobacillus casei in
mice.
Gann, 72, 517.

44. KATO, J., T. YOKOKURA and M. MUTAI, 1983:
Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice.
Microbiol. Immunol. 27, 611.
45. KELLER, R., 1984:
Multizentrische Doppelblindstudie über die
Wirkung von Broncho-Vaxom bei chronischer
Bronchitis.
Schweiz. Med. Wschr. 114, 934.
46. KERN, E.R., L.A. GLASGOW and J.C. OVERALL, 1976:
Antiviral activity of an extract of *Brucella abortus*: induction of interferon and
immunopotential of host resistance.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 152, 372.
47. KIRCHNER, H., M.T. SCOTT, H.M. HIRT, K. MUNK, 1978:
Protection of mice against viral infection
by *Corynebacterium parvum* and *Bordetella pertussis*.
J. Gen. Virol. 41, 97.
48. KLEIN, J.R., M.F. KAGNOFF, 1984:
Nonspecific recruitment of cytotoxic effec-
tor cells in the intestinal mucosa of anti-
gen primed mice.
J. Exp. Med. 160, 1931.
49. KOBAYASHI, F., T. NAGOYA, T. KOSHI and S. SAINO,
1980:
Biphasic protection against bacterial in-
fection in mice induced by vaccination of
Propionibacterium acnes.
Infect. Immun. 27, 391.

50. KONDO, M., H. KATO, T. JOSHIKAWA, M. KATANO and M. TORUSI, 1982:
Clinical evaluation of anticancer activity of a streptococcal preparation OK 432 (Pici-banil). In: Bacteria and Cancer, eds.: J. Jeljaszewics, G. Pulverer, W. Roszkowski. Academic Press, London, 1982, 415.
51. KÜHNEL, S., H.D. GRÜNDER, 1985:
Vergleichende Untersuchungen über die prophylaktische und therapeutische Wirkung der Interferoninducer Bayferon^R, Imuresp^{P^R} und B.S.K.^R bei der enzootischen Bronchopneumonie der Jungrinder.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 92, 379.
52. LOSA, G.A., G.J.M. MAESTRONI, 1984:
Klinische und immunbiologische Wirkung eines oral verabreichten Bakterienextraktes.
Schweiz. med. Wschr. 114, 930.
53. MANDEVILLE, R., N. ROCHELEAU and J.M. DUPUY, 1982:
In vitro modulation of NK-activity by adjuvants : Role of interferon. In: NK-cells and other effector cells.
Academic Press, 1982.
54. MATHEWS, H.L., 1981:
Antitumor effects of a variety of nonviable bacteria against the murine EL-4 lymphoma.
Cancer Immunol. Immunther. 12, 81.
55. MATSUBARA, S., F. SUZUKI and N. ISHIBA, 1979:
Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK 432..
Cancer Immunol. Immunther. 6, 41.

56. MAYR, A., RAETTIG, H., H. STICKL und M. ALEXANDER, 1979:
Paramunität, Paramunisierung, Paramunitäts-inducer. Teil I und II.
Fortschr. Med. 97, 1159 | 1205.
57. MAYR, A., B. HIMMER, G. BALJER und J. SAILER, 1979:
Erregerunspezifische Prophylaxe und Therapie von *Pseudomonas aeruginosa*- Wundinfektionen mittels Paramunisierung im Mäusemodell.
Zbl. Bak. Hyg. I. Abt. Orig.A, 244, 506.
58. MAYR, A., M. BÜTTNER, S. PAWLAS, V. ERFLE, B. MAYR, R. BRUNNER und K. OSTERKORN, 1986:
Vergleichende Untersuchungen über die immunstimulierende (paramunisierende) Wirksamkeit von BCG, Levamisol, *Corynebacterium parvum* und Präparaten aus Pockenviren in verschiedenen "in vivo"- und "in vitro"- Testen.
J. Vet. Med. B, 33, 321.
59. METCALF, D., 1977:
Hemopoietic colonies. In vitro cloning of normal and leukemic cells.
Recent Results in Cancer Research, 61.
Springer, Berlin.
60. MOEHRING, J.M., B.R. FORSYTH, 1971:
The role of the interferon in respiratory syncytical virus infection.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 1009.
61. MORIYASU, F., H. MIWA, K. ORITA, 1982:
Immunochemotherapy of gastric cancer patients with OK 432. In: Immunomodulation by microbial products and related synthetic compounds eds.: Y. Yamamura, S. Kotani, Excerpta Medica, Amsterdam, 1882, 442.

62. MÜLLER, K., 1982:
Feldversuch mit einem weiteren Interferon-
Inducer.
Tierärztl. Umschau, 37, 31.
63. NOSIK, N.N., L.A. LAVRUKHINA, F.I. ERSHOV, 1984:
Protective action of double-stranded inter-
feron- inducing complexes against experi-
mental encephalomyocarditis in mice.
Bull. Exp. Biol. Med. 97, 455.
64. NOUGAYREDE, A., 1980:
Immunostimulation. Etudes des quelques lysats
bactériens.
These pour le Doctorat Veterinaire, Ecole Na-
tional Veterinaire d' Alfort, Paris, 1980.
65. OETTGEN, H.F., C.M. PINSKEY and L. DELMONTE, 1976:
Treatment of cancer with immunomodulators.
Corynebacterium parvum and Levamisole.
Med. Clin. North Am. 60, 511.
66. OSHIMI, K., M. SUMIYA, N.GONDA, S.KANO and F.TAKAKU,
1979:
Enhancement of natural killer cell activity
by a streptococcal preparation, OK 432.
Clin. Immunol. 11, 867.
67. OSHIMI, K., S. KANO, F. TAKAKU and K. OKAMURA, 1980:
Augmentation of mouse natural killer cell ac-
tivity by a streptococcal preparation, OK 432.
J. Nat. Cancer Inst. 65, 1265.
68. PUCETTI, P., A.SANTONI and C. RICCARDI, 1978:
Monitoring of macrophage activation by immuno-
adjuvants in mice as judged by functional
criteria.
Boll.Soc. Ital. Biol. Sper. 54 (20), 1936.

69. PUCETTI, P., 1980:

Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice.

Int. J. Cancer 25, 153.

70. PUIGDOLLERS, J.M., G.R. SERNA, I.H. DEL REY, M.T.T.

BARUFFET, J.J. TORROELLA, 1980:

Immunglobulin production in man stimulated by an orally administered bacterial lysate.

Respiration, 40, 142.

71. RAETTIG, H., 1976:

Aktivitätssteigerung von Alveolarmakrophagen bei der Maus nach Inhalationsimpfung mit IRS-19.

Krankenhausarzt 49, 230.

72. RAETTIG, H., 1982a:

Paramunity after oral immunisation.

Poumon-coeur 38, 285.

73. RAETTIG, H., 1982b:

Paramunität nach oraler Antigen-Applikation.

Sonderdruck aus Fortschritte der Medizin

Nr. 17 vom 6.5. 82, 729.

74. RÖDDER, H., D. THUMANN and E. THUMANN, 1979:

Anwendung eines viralen Interferoninducers (Bayferon^R) zur Bekämpfung der Enzootischen Bronchopneumonie der Rinder (sog. "Rinder-grippe") unter Praxisbedingungen.

Tierärztl. Umschau 34, 720.

75. ROSKOWSKI, W., M. KOBUS, M. LUCZAK, H.L.KO, S.

SZMIGIELSKI, B. LASKOWSKA, G. PULVERER and

J. JELJASZWICZ, 1980a:

Action of three species of Propionibacteria on experimental tumor system in mice.

Zbl. Bakt., Hyg., I. Abt. Orig. A, 246, 405.

76. ROSKOWSKI, W., H.L. KO, K. ROSKOWSKI, S. SZMIGIEL-ski, J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER, 1980b:
The correlation of susceptibility of different *Propionibacterium* strains to macrophage killing and antitumor activity.
Med. Microbiol. Immunol. 169, 1.
77. RUDENT, A., R. ZALISZ, M.F. SALLES, A.M. QUERO and P. SMETS, 1984:
Enhancement of resistance to experimental infections by a purified immune modulator of bacterial origin (Biostim).
Persönliche Mitteilung, Centre de Recherche Immunologique des Laboratoires Cassenne, Osny, France.
78. RUIZ-BRAVO, A., M. JIMENEZ-VALERA, G. ALVAREZ de CIENFUEGOS, C. RUIZ, K. KOUWATLI and A. RAMOS-CORMEZANA, 1985:
Immunomodulation in mice by experimental infection with *Yersinia enterocolitica*.
Microbiol. Immunol. 29, (11), 1089.
79. SAKITA, M., N. KAGEYAMA, S. MAJIMA, 1985:
Comparative studies between liposomes containing muramyl dipeptide and various immunomodulators on activation of mouse peritoneal macrophages and NK-cells.
Oncology 42 (4), 259.
80. SCHINDLER, L., G. STEISSLE, H. KIRCHNER, 1981:
Protection of mice against Mouse Hepatitis virus by *Corynebacterium parvum*.
Infect. Immun. 32, 1128.

81. SCHLEUPNER, C.J., L.A. GLASGOW, 1978:
Peritoneal macrophage activation indicated
by enhanced chemiluminescence.
Infect. Immun. 21, (3), 886.
82. SCHLEWINSKI, E., N. GRABEN, J. FUNK, E. SAHM und
H. RAETTIG, 1971:
Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
13. Mitt.: Persorption und Sekretion von
Mikroorganismen im Tierversuch.
Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig.A, 218, 93.
83. SCHULTZ, R.M., J.D. PAPAMATHEAKIS and M.A. CHIRI-
GOS, 1977:
Interferon: an inducer of macrophage acti-
vation by polyanions.
Science 197 (1), 674.
84. SCHULTZ, R.M., M.A. CHIRIGOS, N.A. PAVLIDIS, J.S.
YOUNGNER, 1978:
Macrophage activation and antitumor activity
of a Brucella abortus ether-extract, Bru-Pel.
Cancer Treat. Rep. 62, 1937.
85. SCHULZE, H.J., C. JASCHINSKI und H. RAETTIG, 1973:
Orale Immunisierung mit nicht-vermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
17. Mitt.: Zeitkinetik der unspezifischen
Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.A, 225, 273.

86. SPENCER, J.C., R. GANGULY and R.H. WALDMAN, 1977:
Nonspecific protection of mice against influenza virus infection by local or systemic immunisation with Bacillus Calmette-Guerin.
J. Infect. Dis. 136, 171.
87. SPREAFICO, F., 1980:
Current problems with immunopotentiating agents; In: Doria Eshkol: The immune system: function and therapy of dysfunction
Academic Press, London, pp. 189.
88. SPREAFICO, F., 1985:
Problems and challenges in the use of immunomodulating agents. A general introduction.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 76, S1, 108.
89. TAGLIABUE, A., W. LUINI, D. SOLDATESCHI and D. BORASCHI, 1981:
Natural killer activity of gut mucosal lymphoid cells in mice.
Eur. J. Immunol. 11, 919.
90. TAGLIABUE, A., 1982:
Characteristics of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria.
J. Exp. Med. 155, 1785.
91. TAKAHASHI, M., T. USHIMA and Y. OZAKI, 1984:
Enhancement of resistance in mice stimulated by Pityrosporum against Salmonella typhimurium.
Immunology 51, 677.

92. TRACEY, D.E., S.A. WOLFE, J.M. DURDIK and C.S. HENNEY, 1977:
BCG-induced murine effector cells
I. Cytolytic activity in peritoneal
exsudates: An early response to BCG.
J. of Immunol. 119 (3), 1145.
93. USHIDA, A., M. MICKSHE, 1983:
Intra-pleural administration of OK 432 in
cancer patients: activation of NK-cells
and reduction of suppressor cells.
Int. J. Cancer 31, 1.
94. WAKASUGI, H., 1982:
In vivo potentiation of human natural killer
(NK) cell activity by a streptococcal pre-
paration, OK 432.
J. Jap. surg. Soc. 83, 150.
95. WOLF, G., 1986:
Kolonienstimulierende Aktivität in Mäuse-
seren nach Vorbehandlung mit Inducern aus
Pockenviren und anderen Mikroben.
Vet. Med. Diss., München 1986.
96. WOLFE, S.A., D.E. TRACEY, C.S. HENNEY, 1977:
BCG-induced murine effector cells.
J. Immunol. 119, 1152.
97. WOLFE, S.A., D.E. TRACEY and C.S. HENNEY, 1977:
BCG-induced murine effector cells.
J. Immunol. 119, 1152.
98. YARKONI, E., A. WANG and A. BEKIERKUNST, 1977:
Stimulation of macrophages by cord factor
and by heat-killed and living BCG.
Infect. Immun. 10, 1202.

99. YOUNGNER, J.S., G. KELETI, D.S. FEINGOLD, 1974:
Antiviral activity of an ether-extracted
nonviable preparation of Brucella abortus.
Infect. Immun. 10, 1202.
100. YOUNGNER, J.S., D.S. FEINGOLD, G. KELETI, 1978:
Overview of the activity of a Brucella
abortus preparation, Bru-Pel.
Cancer Treatment reports, 26 (11), 1915.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. G. Baljer möchte ich mich herzlich bedanken für die wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern in seinem Labor Susanne Hill und Beate Friedrichs für das angenehme Arbeitsklima und die stets freundliche Hilfe.

LEBENS LAUF

Geboren: am 12. März 1961 in Erlangen

Eltern: Prof. Dr. med. Joachim Borneff
Margarete Borneff, geb. Sieges

Schulbesuch: 1967-1971 Grundschule Mainz-Zahl-
bach
1971-1979 Staatliches Frauenlob-
Gymnasium in Mainz

Abitur: 11. Juni 1979

Studium: 1979-1985 an der Ludwigs-Maximil-
lians-Universität in München,
Fachbereich Tiermedizin

Staatsexamen: 11. April 1985

Bestallung: 9. Mai 1985

**Tierärztliche
Tätigkeit:** seit Mai 1985 am Institut für
Medizinische Mikrobiologie der
Tierärztlichen Fakultät der Uni-
versität München als Doktorand

